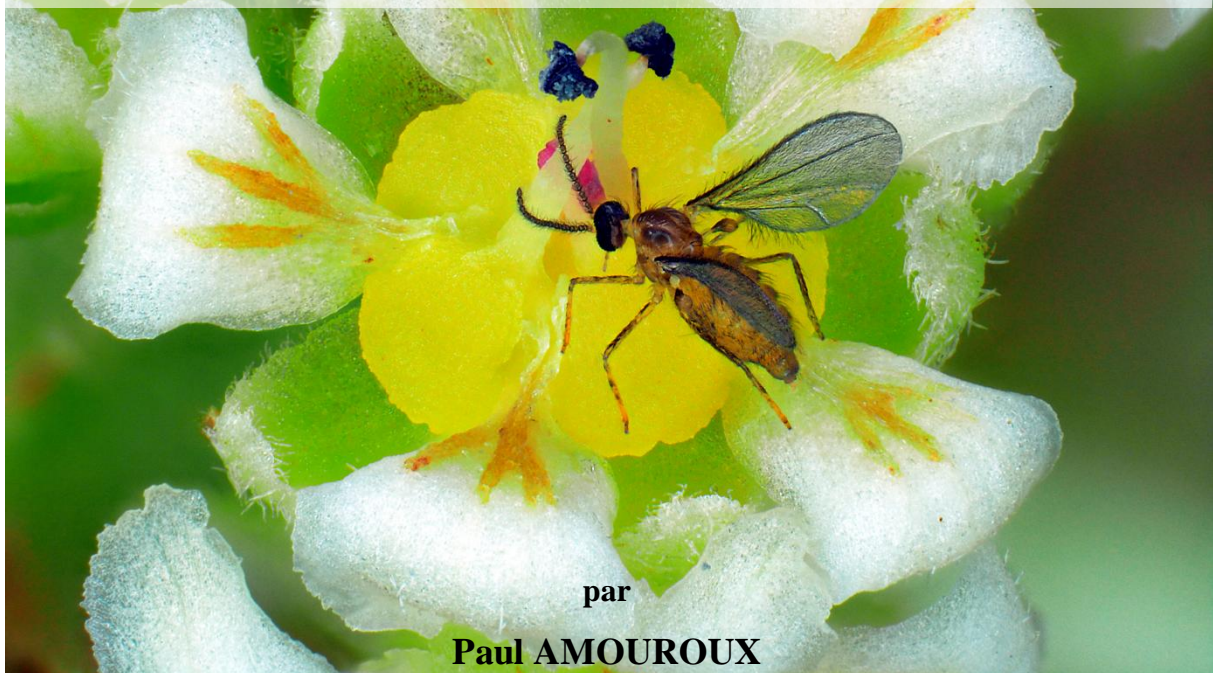


## THESE

Présentée à l'Université de La Réunion pour obtenir le  
DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Biologie des populations et écologie  
Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé (E.D.S.T.S)  
Laboratoire : UMR 53, Peuplement des Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical

**Bio-écologie et dynamique des populations de cécidomyie  
des fleurs (*Procontarinia mangiferae*), un ravageur inféodé au  
manguier (*Mangifera indica*), en vue de développer une lutte  
intégrée**



par

**Paul AMOUROUX**

**Soutenue le 3 juillet 2013 devant un jury composé de**

Stéphane POUSSIER, Professeur, Université de La Réunion, UMR PVBMT  
Alain ROQUES, Directeur de recherche, INRA, UR ZF, Orléans  
Thomas GUILLEMAUD, Directeur de recherche, INRA, UMR ISA, Sophia  
Virginie RAVIGNE, Chercheuse, CIRAD, UMR BGPI, Montpellier  
Samuel NIBOUCHE, Chercheur, CIRAD, UMR PVBMT, La Réunion

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Directeur


**Co-encadrants :** Frédéric NORMAND (CIRAD HortSys) et Hélène DELATTE (CIRAD PVBMT)

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier particulièrement mes trois encadrants qui ont, chacun à leur manière, participé à l'équilibre et au bon déroulement de cette thèse.

En premier, je souhaite remercier Frédéric Normand, sans qui ce projet de thèse n'aurait pas pu se concrétiser. Pendant mon volontariat civil au sein son équipe, l'idée d'une thèse est lancée sur cette petite cécidomyie dont on ne sait pas grand-chose. Sans sa persévérance et son soutien, ce projet n'aurait certainement jamais abouti. Merci aussi pour ton encadrement et ton implication au quotidien, pour m'avoir fait découvrir la culture du manguier et ses particularités, et pour tes qualités humaines qui m'ont fait tant apprécier le travail au sein de ton équipe pendant plus de cinq ans !

En deuxième, je souhaite remercier Hélène Delatte, qui dès le début s'est associée à cette thèse. Ton soutien inconditionnel aura été précieux pour le démarrage puis la réussite de cette thèse. Tu m'as fais confiance et m'as formé à des outils et une discipline que je ne connaissais pas. Merci ! Ton enthousiasme et ton dynamisme sont un vrai moteur pour les personnes avec qui tu travailles. Il n'y a jamais d'obstacles (ou presque !) lorsqu'il s'agit d'ADN et de petites bêtes. Je garderai aussi quelques souvenirs mémorables  du congrès en Corée du Sud passé avec toi et Bernard Reynaud. J'en profite pour le remercier de m'avoir accueilli au sein de l'unité PVBMT.

Last but not least, je tiens à remercier mon directeur de thèse Samuel Nibouche d'avoir accepté de m'encadrer et d'avoir participé à l'équilibre de cette thèse par ton approche globale et ta prise de recul par rapport aux problématiques. Ta rigueur et ton pragmatisme m'ont souvent aidé à me recadrer quand trop d'idées germées dans ma tête. Merci aussi pour tes lectures et re-lectures critiques des articles et du manuscrit. Ton encadrement m'a fortement enrichi professionnellement.

J'adresse également toute ma gratitude à Stéphane Poussier, Alain Roques, Thomas Guillemaud et Virginie Ravigné d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je ne doute point que nos prochains échanges me feront encore progresser.

Merci à Isabelle Badenhauer qui m'a fait découvrir le monde de la recherche et des insectes, il y a quelques années maintenant et sans qui je n'aurai certainement jamais pris cette voie.

Merci aux agriculteurs qui m'ont ouvert leurs vergers pour que je puisse faire mes suivis échantillonnages et avec qui les échanges ont toujours été particulièrement enrichissants. Je remercie tout particulièrement Mr. Law Yat et Xavier Desmulier (CPEA) qui m'ont ouvert malgré les contraintes leur verger quasi quotidiennement pendant la floraison.

Merci, aussi à toutes les cécidomyies qui ont fait don de leur corps à la Science !!

J'ai eu la chance de travailler au sein de deux unités du CIRAD, juste séparées par une 2x2 voies. Je remercie vivement toutes les personnes que j'y ai côtoyées pendant ces trois années de thèse (et même un peu avant) :

...à la station de Bassin Plat, j'ai vraiment apprécié l'ambiance chaleureusement et agréable qui règnent sur la station. Merci à Thierry, Mathieu, Patrick et Fabrice pour leur bonne humeur quotidienne et les échanges que l'on a pu avoir. Merci aux techniciens qui m'ont donné des coups mains fort utiles : Philippe, Doralice, Gilles, Frédéric P., Marie D., et Christian (qui m'a fait concurrence certains soirs pour fermer la station !). Merci à toutes les forces vives de BP qui participent à la bonne ambiance de la station, certain(e)s sont même devenu(e)s des ami(e)s au fil du temps ! Merci à mes collègues de bureau : Claire, Thibault et Anaëlle ! Merci aux deux derniers thésards de BP : Elodie et Thibault et bon courage pour la fin ! Merci à Claire et Eléonore qui n'ont pas perdu leur motivation malgré les dizaines de milliers de larves à compter ! Enfin, merci à toutes les personnes que j'ai croisé plus ou moins longtemps : Marie L., Liliane, Amélie, Camille, Marie R., Murielle... Merci zot tout !

... au 3P, je ne pourrai remercier individuellement toutes les personnes que j'ai croisées tant il y a de l'animation et de l'activité dans cette petite fourmilière. Merci à toutes les personnes qui participent à son bon fonctionnement au quotidien, et à tous celles et ceux qui m'ont fait partagé leur passion pour la recherche. Je vais, quand même, remercier tout particulièrement : Lulu (grand mélomane de la salle de BioMol et le Lucky Luke de la pipette), Martial, Richard et Antoine (pour les superbes photos qui illustrent ma thèse). Merci également à Michel pour les tournois d'échec endiablés, aux Séb' (grand ou malgache), aux Fred' du Sud (petit ou crâne luisant), à Pierre et Daphné, Cathy, Audrey, ...

Quelques dédicaces particulières, aux joueuses et joueurs de basket-ball pour ces lundis soirs pleins de rebonds et de détente (Alice, Adrien, Charlotte, Mathieu, Mathilde, Olivier, Sarra), à Ludo et Suzy (les tous nouveaux parents), et aux ornithos et ami(e)s de la SEOR (F-X, Martin, Jean-Marc, Isabelle, Gaël, Emilie, Damien, Jerry, Marie-Laure, Annie-Claude...).

Je souhaiterais remercier ma belle-famille (et Guillaume, qui sait peut-être futur beau-frère !) pour m'avoir intégré en leur sein et m'avoir fait découvrir toute la richesse de la culture créole réunionnaise (et je ne parle pas uniquement de gastronomie !). Merci pour ces week-end passés en votre compagnie ! Les cartes vont de nouveau être de sortie !

Merci à mes parents Agnès et Louis, à ma sœur Julie et à mes grands-parents qui malgré la distance sont toujours présents à mes côtés et dans mon cœur. Un merci à Alain, Juju, et Thérèse qui m'ont accueilli lors de mes séjours avignonnais

Merci à toi, Aurore, sans qui mon existence serait bien fade ! Merci pour ta patience et pour supporter mon caractère de tête de mule. Je t'aime !

<b>Remerciements .....</b>	<b>2</b>
<b>Sommaire.....</b>	<b>4</b>
<b>Résumé en français .....</b>	<b>7</b>
<b>Résumé en anglais .....</b>	<b>8</b>
<b>Publications personnelles autour de <i>P. mangiferae</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>13</b>
<b>Chapitre I Synthèse bibliographique.....</b>	<b>16</b>
I.1. Les relations entre les insectes et leurs ressources.....	16
I.1.1. Les plantes, une ressource hétérogène dans le temps et dans l'espace .....	17
I.1.2. Détection et déplacement vers la ressource .....	17
I.1.3. Adaptations et spéciations .....	18
I.1.4. L'importance de la synchronisation .....	19
I.2. La diapause, une stratégie majeure de survie dans le temps .....	21
I.2.1. L'induction de la diapause .....	23
I.2.2. Levée de diapause .....	24
I.2.3. Les différents types de diapause .....	24
I.3. Les cécidomyies, une famille liée aux plantes.....	25
I.3.1. Biologie.....	26
I.3.1. Les galles, une caractéristique des cécidomyies .....	28
I.3.2. La synchronisation des cycles de vie.....	28
I.3.3. La diapause chez les cécidomyies .....	30
I.3.4. Espèces d'importance économique agricole et méthodes de lutte .....	30
Références bibliographiques.....	31
<b>Chapitre II Contexte et modèle d'étude .....</b>	<b>39</b>
II.1. La Réunion, une ile subtropicale aux conditions très variées .....	39

II.2. Le manguier, un fruitier d'importance mondiale en zone tropicale .....	41
II.2.1. Origine, sélection et diffusion.....	41
II.2.2. Production mondiale .....	42
II.2.3. Cycle phénologique.....	42
II.2.4. Le manguier à la Réunion.....	45
II.2.5. Les ravageurs du manguier à la Réunion .....	48
II.3. Cécidomyies du manguier .....	48
II.3.1. Généralités .....	48
II.3.2. <i>Procontarinia mangiferae</i> .....	50
Références bibliographiques.....	58
<b>Chapitre III Diversité et structure génétique des populations de la cécidomyie des fleurs du manguier .....</b>	<b>61</b>
III.1. Développement de marqueurs moléculaires : les microsatellites.....	61
ARTICLE A: Isolation and characterization of microsatellite markers from <i>Procontarinia mangiferae</i> (Felt). .....	62
III.2. Diversité et structure génétique des populations de <i>P. mangiferae</i> à l'île de la Réunion .....	66
ARTICLE B: Invasive mango blossom gall midge, <i>Procontarinia mangiferae</i> (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations. ....	68
III.3. Conclusion du chapitre .....	93
Références bibliographiques.....	94
<b>Chapitre IV Diapause de la cécidomyie des fleurs du manguier .....</b>	<b>100</b>
IV.1. Présentation.....	100
ARTICLE C: Diapause of the mango blossom gall midge, <i>Procontarinia mangiferae</i> (Felt) in Reunion Island.....	103
Abstract.....	103
Introduction.....	104
Materials and methods.....	105
Results .....	108
Discussion.....	114
Supplementary data .....	117

IV.2. Conclusion du chapitre .....	119
Références bibliographiques.....	119
<b>Chapitre V Dispersion de la cécidomyie des fleurs du manguier .....</b>	<b>122</b>
V.1. Présentation.....	122
ARTICLE D: Immigration of the mango blossom gall midge, <i>Procontarinia mangiferae</i> (Felt) in a mango orchard mediated by insect flight abilities and by mango resources: a modelling approach .....	125
Materiel and methods .....	128
Results .....	136
Discussion.....	145
Conclusion and perspectives.....	148
Acknowledgements .....	149
V.2. Conclusion du chapitre .....	150
Références bibliographiques.....	150
<b>Chapitre VI Discussion et Perspectives .....</b>	<b>153</b>
VI.1. Une seule espèce pour deux types de ressource d'une plante-hôte.....	153
VI.2. Un faible signal de structuration spatiale des populations ?.....	155
VI.3. Les stratégies de vie de la cécidomyie des fleurs du manguier .....	157
VI.3.1. Traits de vie.....	157
VI.3.2. Une diapause facultative dans un habitat presque toujours favorable....	158
VI.4. Perspectives appliquées en terme de contrôle des populations.....	161
<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>164</b>
Références bibliographiques.....	165
<b>Annexes.....</b>	<b>169</b>
I. Effet de la température et de l'humidité sur la durée de nymphose sans diapause chez la cécidomyie des fleurs du manguier, <i>Procontarinia mangiferae</i> (Felt).....	169
II. Identification et phénologie de trois parasitoïdes de la cécidomyie des fleurs du manguier, <i>Procontarinia mangiferae</i> (Felt), à l'île de la Réunion. ....	174
III. Stades reproducteurs du manguier.....	182
IV. Stades végétatifs du manguier .....	183
V. Script R du modèle 2 de dispersion de la cécidomyie des fleurs du manguier ..	184

Les relations complexes qui unissent les insectes phytophages et les plantes peuvent être étudiées par des approches interdisciplinaires à diverses échelles. Ces études peuvent avoir un intérêt appliqué, dans l'agriculture notamment. Au cours de cette thèse, nous avons mené une étude interdisciplinaire sur la biologie de la cécidomyie des fleurs du manguier, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae), un bio-agresseur monophage et invasif responsable de dégâts économiques majeurs dans plusieurs zones de production du monde.

L'objectif était d'améliorer les connaissances sur la biologie de cette espèce à l'île de la Réunion : (1) en évaluant sa diversité génétique et les facteurs écologiques et biologiques qui peuvent expliquer la structuration génétique de ses populations ; (2) en étudiant en milieu naturel ou contrôlé les caractéristiques de sa diapause, qui lui permettent de maintenir des populations d'une saison de floraison à la suivante ; (3) en étudiant par modélisation la dispersion des femelles dans un verger lors de sa colonisation, en prenant en compte les capacités de vol et la distribution spatiale et temporelle des stades sensibles du manguier au sein du verger.

Les résultats ont montré que l'espèce *P. mangiferae* se reproduisait à la fois sur les inflorescences et sur les jeunes feuilles, qu'elle était présente toute l'année et sur tous les sites échantillonnés sur l'île, quelles que soient les conditions culturales ou climatiques. Ses populations sont apparues structurées en deux clusters sympatriques, dont un était plus fréquent dans la zone de culture du manguier. Ensuite, nous avons prouvé l'existence d'une diapause facultative induite toute l'année, avec cependant un taux d'induction de diapause supérieur en été. Cette diapause du troisième stade larvaire se déroule dans le sol et dure entre six semaines et plus d'un an. Les températures fraîches déclenchent les émergences des individus en diapause et permettent de synchroniser l'émergence des adultes avec la période de floraison du manguier. Enfin, nous avons montré que des femelles immigrantes étaient capables de coloniser l'ensemble des arbres d'un verger. Le vol d'arrivée des femelles dans le verger et le vol actif au sein du verger se sont avérés influencés respectivement par l'abondance et par l'attractivité de la ressource.

Les connaissances obtenues sur la biologie de *P. mangiferae* et sur ses relations avec le manguier ouvrent des pistes pour le développement de stratégies de gestion agroécologique de ce bio-agresseur.



Phytophagous insects and plants are linked by complex relationships. Insect-plant interaction researches involve several biological disciplines at different levels of analysis. These insect–plant relationships are of crucial importance from an applied point of view, notably for agriculture. In this work, an interdisciplinary approach has been used to study on the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae), an invasive insect pest specific to mango causing major economic damages worldwide.

The objective was to improve our knowledge of the biology of this species in the subtropical Reunion Island (i) by describing its genetic diversity and investigate the ecological and biological determinants of the genetic structure of its populations, (ii) by carrying out field and controlled experiments to understand the diapause strategies involved in maintaining populations from one flowering season to the next one, (iii) by modeling the arrival and dispersion of females within an orchard in relation with their flight capacity and with the spatial and temporal distribution of the mango susceptible resources.

The results showed that the single species *P. mangiferae*, feeding on both inflorescences and young leaves, was present all year round and in all the sampled sites on the island, regardless of the climatic and cultural conditions. Populations in Reunion Island appeared structured into two clusters in sympatry, one cluster being more frequent in the cultivated mango area. Secondly, we demonstrated the occurrence of facultative diapause all year round, with the highest rate of diapause observed in summer. The diapause allowed a developmental arrest at the 3rd larval instar in the soil, lasting between six weeks to more than one year. The decrease of temperature at the beginning of winter triggered off the emergence of diapausing individuals and synchronized adult emergence with the mango flowering period. Thirdly, non-native female gall midges were able to colonize all the trees of an orchard. Their arrival flight and trivial flight were oriented by the abundance and by the attractiveness of the mango resources, respectively.

The knowledge obtained on the biological cycle of *P. mangiferae* and on its relationships with the mango tree should be useful to develop new agroecological pest management strategies.



\* Publications écrites au cours de la thèse

**Publications dans des revues à impact facteur**

- \* **Amouroux P**, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2013) Invasive mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations. *Biological Invasions* 15 (8):1677-1693.
- \***Amouroux P**, Normand, F., Nibouche S., Delatte, H. 2012. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Procontarinia mangiferae* (Felt). In: Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 August 2011-30 september 2011. *Molecular Ecology Resources*, 12 (1) : 185-189.
- \*Bricca E, Nibouche S, Delatte H, Normand F, **Amouroux P** (soumis) Test of the pathogenicity of two commercial *Beauveria* strains pathogenic on third instar larvae of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae)? Fruits.

**Communications à des congrès (la personne ayant présentée est soulignée)**

- \***Amouroux P**, Delatte H., Nibouche S., Chadœuf J. and Normand F. (2013) Genetics and biology of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae*, a pest with highly adaptable life strategies. In: *10th International Mango Symposium*, 2010-06-03/2010-06-07, *Punta Cana, Dominican Republic*.
- \***Amouroux P**, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2012) Ecological plasticity and genetic diversity of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt), in Reunion Island. In: XXIV International Conference of Entomology, 2012-08-19/2012-08-25, Daegu, South Korea.
- Amouroux P**, Normand F. 2010. Survey of mango pests on Reunion Island, with a focus on pests affecting flowering: In: *9th International Mango Symposium (book of abstracts)*, 2010-04-08/2010-04-12, 8-12., p. 24, Sanya, Chine.

**Autres publications autour de *P. mangiferae***

- \***Amouroux P**. 2011. Cécidomyie des fleurs du manguier : bien enherber son verger. *Bulletin de Santé du Végétal* n°3 – Mai 2011. Ile de la Réunion.
- Amouroux P**, Normand F., Vincenot D. 2009. Le raisonnement de la conduite du verger. In : Vincenot Didier (ed.), Normand Frédéric (ed.). Guide de production intégrée de mangues à la Réunion. Montpellier : CIRAD, p. 75-104.

### Chapitre II

Table 1 : Détails des organes attaqués et de la pupaison au sol pour les 19 espèces de cécidomyies inféodées au manguier

### Chapitre III

Table 0: Characterization of microsatellite loci isolated from *Procontarinia mangiferae*

Table 1: Characteristics of the 28 sites where *P. mangiferae* populations were sampled

Table 2: Parameters characterizing the genetic variability of 27 populations of *P. mangiferae* on Reunion Island

Table 3: Analyses of molecular variance of the 27 populations of *P. mangiferae* sampled on Reunion Island

Table 4: Genetic differentiation between sites where populations of *P. mangiferae* were sampled

### Chapitre V

Table 1: Summary of subscripts, variables of the model, state variables and estimated parameters used in the model description.

Table 2: Model parameters estimated for Model 1 and Model 2 by maximum likelihood method.

Table 3: Statistics of the linear adjustments between observed and simulated data for models 1 and 2

## LISTE DES FIGURES

---

### Chapitre I

Figure 1 : Schéma des différentes phases de la diapause

Figure 2 : Différentes galles provoquées par *Daphnephila* spp. sur *Machilus thunbergii* (Laurales : Lauraceae) à Taiwan

Figure 3 : Représentation schématique de trois histoires de vie des espèces du genre *Asphondylia* au Japon en fonction de la disponibilité de leur plante-hôte.

### Chapitre II

Figure 1: Localisation de l'île de la Réunion dans l'Océan Indien (à gauche) et carte du relief de l'île (à droite).

Figure 2 : Normale de pluviométrie mensuelle et moyenne des températures

Figure 3 : Illustration de l'asynchronisme de croissance chez la variété José

Figure 4 : Cycle phénologique du manguier pour le cultivar Cogshall à Saint-Pierre

Figure 5 : Fruits des deux principaux cultivars de mangues de la Réunion

Figure 6 : Carte des trois zones de productions de mangues à la Réunion et spécificité

Figure 7 : Distribution mondiale de *P. mangiferae*

Figure 8 : Illustrations générales et de détails de la femelle et du mâle de *P. mangiferae*

Figure 9 : Cycle biologique de la cécidomyie des fleurs

Figure 10 : Illustration des stades larvaires et de la pupe de *P. mangiferae*

Figure 11 : Diagramme de la croissance de la population de *P. mangiferae*

Figure 12 : Galles et dégâts de *P. mangiferae* en fonction du type de ressource

### Chapitre III

Figure 1 : Location of sampling sites of *P. mangiferae* on Reunion Island

Figure 2 : Population dynamics of the final instar larvae of *P. mangiferae*

Figure 3 : Results of admixture analysis in STRUCTURE

Figure 4 : Percentage of *P. mangiferae* individuals assigned by STRUCTURE

Figure 5 : First factorial plane of the genetic correspondence analysis

## **Chapitre IV**

Figure 0 : Résumé graphique

Figure 1 : Log10 transformed weekly number of adults emerged per square meter of soil below mango trees

Figure 2 : Monthly rate of diapause of *P. mangiferae*

Figure 3 : Number of adults emerged weekly from larvae in diapause at two constant temperatures

Figure 4 : Number of adults emerged weekly from larvae in diapause for larvae collected in winter and for larvae collected in summer

## **Chapitre V**

Figure 0 : Verger de manguiers dont le sol a été bâché

Figure 1 : The experimental orchard divided in two plots by a windbreak.

Figure 2 : Changes in the number and the phenological stage of the mango resources (inflorescences and young leaves) in the covered plot.

Figure 3 : Spatial distribution of the number of inflorescences and new growth units per tree and of the number of larvae collected per tree.

Figure 4 : Semivariograms for the number of inflorescences per tree and for the density of larvae per resource unit

Figure 5 : Graphical representations of the parameters estimated for the Model 2

Figure 6 : Observed mean number of larvae captured per trap and per date and the 95% confidence interval of the simulated data

Figure 7 : Regression lines between the observed mean number of larvae captured per trap and per date and the median of the simulated data with models 1 and 2

## INTRODUCTION

---

Notre biosphère est dominée par deux règnes étroitement liés, les plantes et les insectes phytophages. Ces deux groupes représentent près de 50% de la diversité biologique mondiale et leurs interactions offrent de nombreux champs de recherche (Schoonhoven *et al.* 2005). Cette diversité a une importance cruciale pour l'Homme, en particulier pour l'agriculture. Les insectes phytophages sont des ennemis majeurs des cultures et des récoltes tandis que les insectes prédateurs et parasitoïdes en sont des auxiliaires essentiels. Les échanges commerciaux à l'échelle mondiale ont favorisé la dispersion et l'introduction de nombreux insectes dans de nouveaux agro-écosystèmes (Moore 2005). Ces milieux cultivés sont fortement perturbés par l'Homme et la monoculture offre une ressource abondante aux insectes (Simberloff & Rejmanek 2011). L'installation d'espèces invasives et leur émergence en tant que ravageurs des cultures sont ainsi facilitées (Sakai *et al.* 2001). Depuis le milieu du 20ème siècle, la modernisation de l'agriculture s'est faite par le biais de la spécialisation des cultures, de la mécanisation et de l'utilisation massive d'intrants chimiques. Cette stratégie maximisant les rendements et les profits à court terme montre ses limites et engendre des coûts socio-économiques et environnementaux non estimés (Malézieux 2012). Une meilleure connaissance des relations entre les insectes et les plantes peut apporter de nouvelles visions et stratégies pour contrôler les ravageurs des cultures.

Parmi ces insectes phytophages, les insectes à galles, dont les Cecidomyiidae regroupent le plus grand nombre d'espèces, ont développé des relations intimes avec leur(s) plante(s)-hôte(s). La cécidomyie des fleurs du manguier, *Procontarinia mangiferae* est un modèle particulièrement intéressant du fait de sa monophagie envers le manguier (Raman *et al.* 2009), de son statut de ravageur sur cette culture qui est la cinquième production fruitière mondiale (FAO 2011), et de son caractère invasif à la Réunion et dans le monde (Gagné 2010). De plus, le contexte climatique et géographique de la Réunion nous permet d'étudier l'adaptation des populations invasives de *P. mangiferae* aux conditions locales, tant vis-à-vis de facteurs biotiques qu'abiotiques.

L'objectif général de la thèse est d'étudier les relations entre *Procontarinia mangiferae* et sa plante hôte exclusive, le manguier, afin d'améliorer les connaissances sur l'un des principaux bio-agresseurs du manguier à la Réunion. Le manuscrit se divise en six parties.

**La synthèse bibliographique** (chapitre I) traite (i) de l'étroite relation entre les insectes et leurs ressources, (ii) de la diapause comme une stratégie de vie assurant une survie dans le temps, et (iii) de l'une des principales familles d'insectes gallicoles les Cecidomyiidae. Le deuxième chapitre présente **le contexte** réunionnais général (géographie, relief, climat), le manguier dans le monde et à la Réunion et enfin le modèle d'étude, la cécidomyie des fleurs du manguier, *Procontarinia mangiferae*.

Les trois chapitres suivants constituent le cœur des travaux de recherche réalisés.

**L'étude de la diversité génétique et structure génétique des populations de *P. mangiferae* à l'île de la Réunion** (chapitre III) s'est basée sur des marqueurs moléculaires (SSR spécialement définis pour cette espèce), un marqueur mitochondrial (COI) et une détermination de l'espèce sur des critères morphologiques. La dynamique annuelle des populations de cécidomyies des fleurs en verger a également été établie. Cette étude est basée sur un échantillonnage prenant en compte la diversité des habitats de *P. mangiferae* (vergers, arbres isolés, tout autour de l'île) et sa faculté à s'attaquer à deux organes : les inflorescences et les jeunes feuilles. Cette étude nous a permis de définir l'occurrence de cette espèce dans le temps et dans l'espace ainsi que sa structure des populations en fonction de facteurs biotiques et abiotiques.

**L'analyse de la stratégie de vie déployée par *P. mangiferae* en climat subtropical** (chapitre IV) a cherché à quantifier l'occurrence de la diapause tout au long de l'année et à déterminer les conditions favorables à la levée de diapause. Des expérimentations en conditions naturelles (vergers) et en conditions contrôlées (laboratoire) ont été menées. Les résultats ont été mis en perspective de la phénologie du manguier à la Réunion.

**Les modes et les caractéristiques de la dispersion de *P. mangiferae*** ont été déterminés par un modèle stochastique et mécaniste d'invasion et de déplacement des femelles dans un verger. Il a permis de tester deux hypothèses d'arrivée des femelles dans un verger de manguier, et de déterminer les paramètres de dispersion et d'attractivité des différents types de ressources (inflorescences, jeunes feuilles) du manguier au sein de ce verger. Cette modélisation est basée sur des données biologiques et un échantillonnage systématique des populations contaminant les manguiers d'un verger d'un demi-hectare pendant une saison de floraison.

Dans la **discussion générale**, les résultats obtenus ont été confrontés pour expliquer les caractéristiques génétiques, biologiques et écologiques de la cécidomyie des fleurs du manguier à la Réunion. Enfin, les perspectives appliquées en termes de contrôle des populations ont été abordées.

## Références bibliographiques

FAO (2011) Groupe Intergouvernemental sur la banane et les fruits tropicaux - Situation actuelle et perspectives à court terme. In: *Comité des produits*, p. 7. FAO, Yaoundé (Cameroun).

Gagné RJ (2010) Update for a catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Digital version 1.

Malézieux E (2012) Designing cropping systems from nature. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 15-29.

Moore BA (2005) Factors contributing to the introduction and spread of alien invasive species. In: *Alien invasive species: Impacts on forests and forestry* (ed. FAO FrD). FAO, Rome, Italy.

Raman A, Burckhardt D, Harris KM (2009) Biology and adaptive radiation in the gall-inducing Cecidomyiidae (Insecta Diptera) and Calophyidae (Insecta Hemiptera) on *Mangifera indica* (Anacardiaceae) in the Indian subcontinent. *Tropical Zoology* **22**, 27-56.

Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.

Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-Plant Biology*, Second edn. 421pp.

Simberloff D, Rejmanek M (2011) Encyclopedia of Biological Invasions. In: *Encyclopedia of the natural world*, p. 765. University of California Press.



### I.1. Les relations entre les insectes et leurs ressources

Les insectes peuvent être classés en deux groupes en fonction du degré de spécialisation de leur régime alimentaire : les espèces généralistes ou euryphages et les espèces spécialistes ou sténophages. Ces dernières regroupent les espèces monophages et oligophages, c'est-à-dire celles se nourrissant respectivement d'une ou plusieurs espèces appartenant à la même famille.

Les insectes phytophages se caractérisent par un fort degré de spécialisation de leur régime alimentaire (Bernays & Chapman 1994). Bien que la part relative des espèces spécialistes et généralistes ne soit pas uniforme entre les ordres d'insectes, la spécialisation apparaît comme la règle générale. Bernays & Graham (1988) ont calculé que moins de 10% des insectes herbivores consomment des plantes venant de plus de trois familles différentes. Ainsi, dans la faune britannique, à l'exception des Orthoptères dont 60% des espèces sont généralistes, plus de 70% des espèces phytophages appartenant aux autres ordres sont spécialistes (Bernays & Chapman 1994). Chez les Hémiptères, Diptères, Hyménoptères et Lépidoptères, ce pourcentage dépasse même les 80% (Bernays & Chapman 1994). Un des aspects de la spécialisation est la relation entre la diversité du régime alimentaire et la taille du corps de l'insecte. Les espèces plus petites sont généralement plus spécialisées que les espèces plus grosses (Lindström *et al.* 1994; Novotny & Basset 1999). Un autre aspect est que les espèces avec un régime alimentaire peu diversifié préfèrent les organes jeunes qui sont plus nutritifs (Hunter 2000) mais qui contiennent plus de substances toxiques (Cates 1980). En plus de la composition nutritionnelle des organes, des facteurs d'ordre physiologique, environnemental et écologique (protection par rapport aux parasitoïdes, microclimat...) sont souvent impliqués dans la spécialisation des espèces phytophages (Schoonhoven *et al.* 2005).

Cette synthèse bibliographique comporte trois parties. Premièrement, nous verrons que les insectes phytophages sont généralement dépendants d'un petit nombre d'espèces de plantes. Mais, les plantes offrent rarement une ressource disponible et de qualité tout au long de l'année. Les insectes doivent être capables de détecter et de reconnaître leur plante-hôte, ce qui met en jeu une séquence de comportements basée sur différents stimuli (visuels, olfactifs, tactiles...). Des modifications au sein de cette relation peuvent être cause de divergence aussi bien au sein des populations d'insectes que des populations de plantes, et conduire à de l'isolement génétique et à de la spéciation. La synchronisation entre le cycle des insectes phytophages et celui de leurs plantes-hôtes est essentielle. Deuxièmement, nous nous intéresserons à la diapause qui est l'une des stratégies de vie qui permettent aux insectes de répondre à la saisonnalité de leur ressource. Nous décrirons les différents types de diapause, et les facteurs biotiques et abiotiques qui en contrôlent l'induction et la sortie. Troisièmement,

nous détaillerons les principales caractéristiques biologiques et écologiques des Cecidomyiidae, l'une des plus importantes familles d'insectes gallicoles.

### **I.1.1. Les plantes, une ressource hétérogène dans le temps et dans l'espace**

Une plante à un stade phénologique donné est une ressource hautement hétérogène dans le temps et/ou dans l'espace, une hétérogénéité à laquelle les insectes doivent s'adapter. La première source d'hétérogénéité réside dans la croissance des plantes qui est généralement soumise à une périodicité saisonnière : la plupart des plantes des zones tempérées cessent leur croissance pendant toute la saison froide. L'hétérogénéité peut également être liée à des facteurs propres aux individus, aux conditions pédoclimatiques locales ou aux conditions de culture pour des plantes cultivées (Schoonhoven *et al.* 2005). Une hétérogénéité intrinsèque entre plantes d'une même espèce ou entre les organes d'une même plante est aussi observable. La composition en métabolites primaires et secondaires des plantes peut varier en fonction des variétés, des conditions pédoclimatiques, de la présence de dégâts antérieurs d'herbivores ou de l'architecture de la plante (Schoonhoven *et al.* 2005). Barber & Nicholas (2010) ont montré que l'abondance d'un hémiptère du chêne, *Corythuca arcuata* Say (Heteroptera : Tingidae), est supérieure dans les arbres éclairés et présentant une faible teneur en carbone. Elle est également positivement corrélée avec la teneur en eau des feuilles. La sélection d'une plante-hôte par les insectes fait intervenir une palette de stimuli olfactifs, visuels, tactiles et gustatifs. Ces stimuli permettent aux insectes de reconnaître leur plante-hôte (à l'échelle de l'espèce) mais aussi de sélectionner une plante particulière (à l'échelle de l'individu) (Schoonhoven *et al.* 2005).

### **I.1.2. Détection et déplacement vers la ressource**

La spécialisation des insectes implique une capacité de reconnaissance de leur plante-hôte, voire de l'organe de cette plante-hôte (Masante-Roca *et al.* 2007). La sélection de la plante-hôte peut être divisée en deux phases consécutives : la recherche puis l'acceptation (Finch & Collier 2000). Cette deuxième phase fait appel à des mécanismes sensoriels spécifiques afin de reconnaître une plante-hôte et sa qualité. Ces mécanismes ne seront pas abordés ici. Nous nous concentrerons sur la recherche de la plante-hôte.

La stratégie de recherche peut être aléatoire ou bien dirigée par des signaux olfactifs ou visuels provenant des plantes elles-mêmes. La modélisation des comportements de recherche montre que les mouvements aléatoires peuvent être un facteur important pour déterminer le succès de cette recherche (Morris & Kareiva 1991). Toutefois, la recherche dirigée est souvent vue comme une adaptation qui augmente l'efficacité de la recherche et qui produit un meilleur rendement par unité de temps et d'énergie investie (Schoonhoven *et al.* 2005).

Un insecte recherchant sa plante-hôte en conditions naturelles est soumis à une multitude de stimuli, qui sont distribués de manière hétérogène. Quantifier expérimentalement l'importance relative des stimuli visuels ou olfactifs est souvent difficile dans ces conditions (Finch & Collier 2000).

### I.1.3. Adaptations et spéciations

Les relations entre un insecte et une plante peuvent être modifiées aussi bien par des facteurs abiotiques comme le climat que par des facteurs biotiques propres aux insectes ou aux plantes. L'adaptation des insectes à de nouvelles conditions de vie ou à de nouvelles contraintes peut être très rapide, comme l'illustre le développement des résistances aux insecticides (Anstead *et al.* 2007; Denholm *et al.* 2002). Ces adaptations peuvent être à l'origine de spéciation en limitant les flux géniques entre populations. Quelques-uns des nombreux mécanismes mutationnels, écologiques et évolutionnaires de spéciation sont présentés dans la synthèse de Loxdale (2010). Quatre principaux facteurs de spéciation sont présentés ici : (i) l'isolement spatial, (ii) les barrières comportementales, (iii) l'allochronie dans les cycles de vie et (iv) les barrières à l'hybridation.

Premièrement, l'isolement spatial est le facteur de spéciation le mieux documenté et qui peut être mis en évidence par de nombreuses méthodes basées sur l'étude du polymorphisme de marqueurs moléculaires (microsatellites, RAPD, RFLP) (Roderick 1996). Les barrières physiques, comme des hauts sommets ou des étendues marines, séparent les différentes populations et interrompent les flux géniques entre elles. Différentes pressions de sélection (nouvel hôte, conditions climatiques...), différentes mutations au sein de chaque population et les effets de la dérive génétique entraîneront une différenciation des populations. Par exemple, deux espèces de chrysomèles *Oreina cacaliae* Schrank et *O. speciosissima* Scopoli (Coleoptera : Chrysomelidae) montrent des différences génétiques importantes entre des populations distantes de 40 à 250 km dans les Alpes (Rowellrahier 1992). L'efficacité de ces barrières dépend fortement de la capacité de dispersion des espèces. Ainsi, chez les espèces à faible capacité de dispersion, des différences peuvent apparaître à des échelles fines comme des arbres voisins (Mopper 1996).

Deuxièmement, les comportements alimentaires ou reproducteurs permettent d'observer des cas de spéciation sympatrique, c'est-à-dire sans isolement géographique. La mouche de la pomme, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera : Tephritidae), est attirée par des composés volatiles des pommes tandis qu'une espèce jumelle *R. mendax* (Curran) est attirée par ceux des myrtilles (Frey & Bush 1990). Ces deux espèces s'hybrident en laboratoire mais des analyses génétiques en milieu naturel montrent qu'il n'y a pas d'échange entre ces deux espèces car les accouplements ont lieu uniquement sur leurs fruits-hôtes respectifs (Feder *et al.* 1990a, b). Les interactions entre un insecte et ses plantes-hôtes sont aussi une source de divergence. Les insectes peuvent manipuler la « chimie » de leur plante

hôte à leur profit. Deux populations sympatriques de la guêpe à galle, *Antistrophus rufus* Gillette (Hymenoptera : Cynipidae), colonisent deux espèces différentes d'Astéracées. Les plantes porteuses de galles induites par *A. rufus* émettent des composés volatiles qui attirent préférentiellement les mâles issus de la même espèce de plante-hôte. Un isolement reproductif est ainsi créé entre les deux populations en fonction de la plante-hôte (Tooker *et al.* 2002).

Troisièmement, le décalage temporel des cycles de vie de l'insecte sur différentes plantes-hôtes (ou différents organes d'une plante-hôte) est une autre source de spéciation. Une étude de Lin & Wood (2002) sur le complexe d'espèces de *Enchenopa binotata* (Say) (Homoptera : Membracidae) a montré qu'un changement de plante hôte avait perturbé les cycles de vie des différentes espèces de ce complexe. Les accouplements des différentes espèces se déroulent de manière décalée dans le temps en fonction de la plante-hôte. Ainsi, les croisements ont été évités ce qui a favorisé leur spéciation en sympatrie.

Quatrièmement, les endosymbiotes peuvent créer des barrières à l'hybridation comme observées chez *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae) à la Réunion (Thierry *et al.* 2011). Chez les insectes, la bactérie *Wolbachia* sp. est largement répandue (Hilgenboecker *et al.* 2008). Transmise verticalement par les femelles à leur descendance, elle participe aux phénomènes d'isolement post-zygotique à travers différents mécanismes d'action selon les espèces : féminisation, élimination des mâles (male-killing), incompatibilité cytoplasmique, etc. (Charlat *et al.* 2003).

Par ailleurs, il existe une variabilité intrinsèque des tissus des plantes-hôtes. Cette variabilité peut être due aux nutriments disponibles et à la composition du sol, aux microclimats, aux différences individuelles entre les plantes, à l'induction de réponses spécifiques suite à une exposition à des conditions abiotiques particulières ou à des dégâts de phytophages par exemple, et/ou à l'interaction de tous ces facteurs (Scriber 2002). Cette variabilité entre plantes d'une même espèce peut être à l'origine de populations d'insectes propres à chaque plante (individu). On parle alors de 'deme' (Mopper 1996).

Les successions d'adaptations sont à l'origine de l'hypothèse de la co-évolution qui a été proposée par Ehrlich & Raven (1964) suite à l'étude de la diversité des papillons et de leurs plantes-hôtes.

#### **I.1.4. L'importance de la synchronisation**

La synchronisation du cycle de vie de l'insecte et de celui de sa plante-hôte est cruciale. Elle détermine la quantité et la qualité de la ressource disponible pour les insectes. Dans les habitats tempérés ou avec des saisons marquées, les espèces doivent synchroniser précisément leur émergence avec le cycle de leur plante-hôte pour disposer de tissus végétaux adéquats pour leur reproduction ou leur alimentation. Au contraire, dans les régions chaudes et humides des tropiques, de nombreuses espèces produisent des générations en continu, comme le papillon monarque (Knight & Brower 2009). La synchronisation influence

plusieurs aspects de la relation plante-insecte. Une mauvaise synchronisation peut entraîner une compétition inter-spécifique avec un autre insecte exploitant la même ressource, ce qui peut réduire l'avantage compétitif de l'une ou des deux espèces (Denno *et al.* 1995). Ainsi, la quantité et la qualité de la ressource modifie la dynamique, la densité mais aussi le risque de prédation ou de parasitisme des populations d'insectes.

Shibata (2001) a montré que les populations d'un hyménoptère induisant des galles dans les feuilles de bambou peuvent fortement se réduire si les dates d'émergence des insectes et de débourrement des jeunes pousses de bambous ne coïncident pas. Les femelles ont alors plus de difficulté à trouver les sites de pontes les plus favorables (avec une meilleure valeur nutritive) c'est-à-dire les jeunes pousses de bambous. La vitesse de développement des chenilles et la masse des chrysalides de *Operophtera brumata* L. (Lepidoptera : Geometridae) est d'autant meilleure que leur émergence coïncide parfaitement avec l'apparition des nouvelles feuilles du chêne *Quercus robur* L., moins concentrées en tannins que les feuilles plus âgées (Feeny 1968). L'effet 'bottom-up' (des plantes sur les insectes) est essentiel dans ce type de relations (Price & Martinsen 1994). L'effet 'top-down' (des ennemis naturels sur les insectes) peut aussi jouer un rôle majeur sur la dynamique des populations. Chez certains papillons nocturnes, les ennemis naturels diminuent le taux de survie des premières populations émergées (Hunter & Elkinton 2000). Les premières populations d'un thrips invasif en Amérique du Nord, *Thrips calcaratus* Uzel (Thysanoptera : Thripidae), explosent du fait qu'elles ne sont pas soumises à la prédation. L'émergence des prédateurs de thrips de cette zone colonisée est plus tardive que celle des prédateurs de sa zone d'origine (Werner *et al.* 2006).

Les conditions naturelles jouent un rôle prépondérant sur la synchronisation et les dynamiques des populations des insectes et des plantes (Singer & Parmesan 2010). L'augmentation des températures liée au réchauffement climatique est une source importante de désynchronisation et/ou de modification des cycles de vie (Ellwood *et al.* 2012). Chez les espèces spécialistes, comme chez le coléoptère *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera : Scolytidae), ces changements peuvent se traduire par l'avancement de la saison de vol d'un mois et par la réalisation, chez certaines populations, de deux générations par an au lieu d'une seule (Mitton & Ferrenberg 2012).

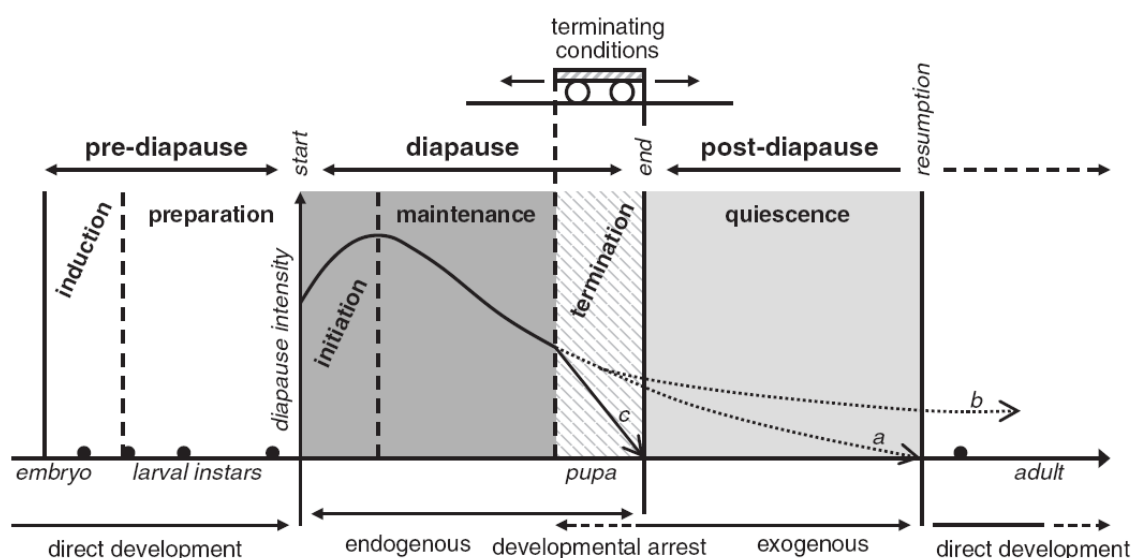
En milieu tempéré, l'hiver, en plus d'être synonyme de basses températures, se caractérise par l'absence de croissance végétative. Les faibles températures et l'absence de ressources alimentaires rendent les conditions de vie des insectes phytophages impossibles. Les insectes adoptent alors diverses stratégies (Danks 2007). Ils peuvent mettre en place un long cycle de vie avec un développement larvaire lent ou une prolongation de la vie de l'adulte avec plusieurs périodes de reproduction (Saulich 2010). Le changement de plante-hôte peut être une autre possibilité dans les milieux où la survie des insectes est possible à un stade actif. Toutefois, les deux stratégies principales pour contourner une saison défavorable

sont la migration (évitement spatial) et la dormance (évitement temporel) (Roberts 1978). Certaines espèces mettent en place ces deux mécanismes en fonction des populations et de leur habitat comme le papillon monarque (Knight & Brower 2009) ou au cours de leur vie comme certains cafards (Tanaka & Zhu 2003). Les stratégies mises en place doivent permettre la survie de l'espèce et assurer une réapparition des insectes synchronisée avec celle de leur plante-hôte. Dans les cas où les adultes ont une courte durée de vie, les œufs et les stades larvaires sont au cœur de ces stratégies de survie. Les individus doivent anticiper le manque de ressource et les conditions de vie difficiles et développer une forme résistante avec des besoins énergétiques très faibles (vie ralentie).

## I.2. La diapause, une stratégie majeure de survie dans le temps

L'une des alternatives des insectes pour survivre à l'absence de ressource sont les arrêts de développement tels que la diapause ou la quiescence. La définition de ces termes pouvant varier entre les auteurs (Kostal 2006), nous allons préalablement préciser la signification que nous utiliserons.

Selon Danks (1987) et Denlinger (1986, 2002), la dormance est le terme le plus général sous lequel sont désignés tous les arrêts de développement, en particulier chez les insectes. La quiescence est une réponse immédiate et directe à l'action d'un ou plusieurs facteurs environnementaux. Ce ou ces facteurs contrôlent l'entrée et la levée de la quiescence. Par contre, la diapause est une interruption qui dévie le métabolisme continu de l'insecte vers un métabolisme d'arrêt spécifique qui précède l'arrivée de conditions défavorables. Ainsi, la diapause est un arrêt programmé en amont du stade où elle est observée. Elle est liée à des mécanismes physiologiques et génétiques.



Chap. I - Figure 1 : Schéma des différentes phases (et sous-phases) de la diapause : pré-diapause (induction, préparation), diapause (initiation, maintenance, levée), post-diapause (quiescence). Source : Kostal 2006

La diapause, au sens large, se divise en trois phases : (i) la pré-diapause (ii) la diapause proprement dite, et (iii) la post-diapause (Figure 1). De nombreuses études ont été conduites sur ces différentes phases avec, en conséquence, l'apparition d'un vocabulaire riche pour désigner un même état. Danks (1987) et plus récemment Kostal (2006) proposent une synthèse de ce vocabulaire. Premièrement, la *phase* (ou période) de *pré-diapause* assure l'*induction* pendant le *stade sensible* de l'insecte et la *préparation* de la diapause (comportement spécifique, constitution de réserves). Deuxièmement, l'*entrée en diapause* au sens strict a lieu durant le *stade réactif*. Un *développement endogène* se met alors en place permettant l'*évolution* ou la *maturation de diapause* jusqu'à restaurer la capacité de l'insecte à répondre aux conditions environnementales. Même si les conditions environnementales sont favorables au développement, les individus entrés en diapause restent dans cet état de vie ralentie. Des processus endogènes et/ou des facteurs environnementaux maintiennent cet état (métabolisme ralenti) mais ils participent à sa lente évolution. La *levée de diapause* est assurée par des conditions environnementales spécifiques qui terminent la maturation de la diapause et permet de synchroniser l'état physiologique des individus au sein d'une population. Troisièmement et dernièrement, la *phase post-diapause* est comparable à une quiescence. L'individu attend le retour des conditions favorables, telles qu'un seuil de température, pour retrouver une activité normale. D'autres termes plus spécifiques sont aussi employés comme l'*aestivation* pour une diapause en saison chaude et la *pluviation* pour une diapause en saison humide.

Généralement, un seul stade peut entrer en diapause pour une espèce donnée. Denlinger (1986) indique que pour 73 espèces tropicales, les stades avec diapause sont dans 7% des cas des œufs, 30% des larves, 32% des nymphes, 31% des adultes. Il existe des exemples de diapause pour tous les stades larvaires mais avec toujours un stade spécifique par espèce. Par ailleurs, la sensibilité aux signaux inducteurs de la diapause augmente en se rapprochant du stade entrant en diapause. En général, la sensibilité est maximale un stade ou deux avant celui entrant en diapause comme chez le papillon *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) (Kurban *et al.* 2007). Des exceptions peuvent exister en particulier chez des espèces se nourrissant à l'intérieur de fruits ou des tissus végétaux. Seuls les œufs et les premiers stades larvaires de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera : Tortricidae), dont les larves pénètrent dans les tissus de sa plante-hôte, sont réceptifs aux stimuli lumineux inducteurs de diapause (Sausen *et al.* 2011). Enfin, la diapause peut aussi être modifiée par la (ou les) générations précédentes (effet parental), comme c'est le cas chez plusieurs espèces du genre *Trichogramma* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) (Reznik *et al.* 2012).



Enfin, la diapause est un mécanisme intéressant pour résister aux conditions extrêmes. Certaines adaptations physiologiques et/ou comportementales spécifiques augmentent cette résistance. Chez le doryphore, le ralentissement du métabolisme et l'enfouissement dans le sol assurent un meilleur taux de survie hivernale (Piironen *et al.* 2011). Une autre adaptation physiologique est une meilleure résistance à la dessiccation et au froid (Rinehart *et al.* 2006), etc. Les individus en diapause sont également moins sensibles aux conditions anaérobies, aux poisons respiratoires et insecticides grâce à leur métabolisme ralenti. Cependant, la diapause augmente la vulnérabilité des insectes aux parasitoïdes, prédateurs et pathogènes de par l'immobilisation des individus (Danks 1987).

### I.2.1. L'induction de la diapause

L'induction est un processus dynamique durant lequel interviennent des signaux environnementaux biotiques et abiotiques (Danks 1987).

**Les deux principaux facteurs abiotiques** participant à l'induction de la diapause sont la photopériode et la température. La photopériode est le facteur cyclique le plus fiable pour définir la saison actuelle et future. Une différence de photopériode de 10 min peut être suffisante pour déclencher une réponse (He *et al.* 2009). Le signal dépend de nombreux facteurs propres à l'insecte. La longueur du jour (photophase) ou de la nuit (scotophase) peut agir en valeur absolue (minutes) ou dynamique (jour de plus en plus court) (Saunders 2011, 2012, 2013). La température apparaît moins fiable pour définir à elle seule la saison. Elle peut être modifiée fortement selon les conditions (position à l'ombre ou au soleil). Le coléoptère, *Epicauta gorhami* Marseul (Coleoptera : Meloidae), entre en diapause à des températures supérieures à 27,5°C quelle que soit la photopériode (Shintani *et al.* 2011). Les variations de température entre le jour et la nuit peuvent aussi être un facteur d'induction comme chez *H. armigera* (Mironidis & Savopoulou-Soultani 2012). La combinaison de la photopériode et de la température dans l'induction de diapause est également possible. Ainsi, Xiao *et al.* (2010) montrent que le taux d'induction de la diapause du papillon *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera : Crambidae) est supérieur pour des scotophases<sup>1</sup> de 11 à 16h combinées avec une température de 28°C. L'humidité et les pluies sont globalement des caractéristiques saisonnières qui peuvent être identifiées aux basses latitudes où la saison des pluies et la saison sèche sont très marquées. Ces composantes sont quelquefois mentionnées comme un facteur d'induction (Vinod & Sabu 2010).

**Les principaux signaux biotiques** participant à l'induction de la diapause sont le régime alimentaire et la composition chimique de la plante-hôte. La ressource a des effets directs sur la croissance et le développement des individus en fonction de sa qualité nutritionnelle (Hunter & McNeil 1997). La composition chimique des plantes-hôtes peut varier au cours du temps et préfigurer la saison à venir. Ainsi, l'augmentation de certains

---

<sup>1</sup> Période d'obscurité d'un cycle jour/nuit

composés dans les végétaux (lipides, protéines) (Danks 1987) ou la baisse de la qualité de la plante (tendreté, azote, eau) (Ishihara & Ohgushi 2006; Takagi & Miyashita 2008) peuvent être des signaux d'induction de la diapause.

Ces facteurs biotiques ou abiotiques peuvent intervenir seuls pour induire la diapause, mais généralement ils agissent en interaction. Toutefois, plusieurs populations au sein d'une même espèce peuvent réagir à des conditions qui leur sont spécifiques (Burke *et al.* 2005; Rajon *et al.* 2009; Xia *et al.* 2012). Chez les populations du papillon *Sericanus montelus* Gray (Lepidoptera : Papilionidae), la durée de photophase critique à partir de laquelle la diapause est induite est positivement corrélée avec la latitude et elle augmente d'environ une heure pour chaque 6,67 degrés de latitude en direction du nord (Wang *et al.* 2012).

### I.2.2. Levée de diapause

La température est un facteur fréquent de levée de diapause (Hodek, 2002, Kostal 2006). Chez les espèces de milieu tempéré, un passage au froid favorise la levée de diapause comme chez le papillon *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (Jiang *et al.* 2010). La photopériode peut aussi intervenir entre autres lors de diapause estivale (Masaki 1980). Une étude sur le papillon *Anarsia lineatella* (Zeller) (Lepidoptera : Gelechiidae) a aussi mis en évidence que les jours longs favorisaient la levée de diapause (Damos & Savopoulou-Soultani 2010). Cette même étude met aussi en avant que la sensibilité à la photopériode des individus en diapause diminue avec l'avancée de la diapause, comme mentionné précédemment par Tauber & Tauber (1976). La levée de diapause peut être aussi modifiée par l'interaction entre la photopériode et la température (He & Wang 2012; Roux *et al.* 1997). L'humidité est un autre facteur de levée de diapause (Hodek 2003). Les périodes de sécheresse et de pluies jouent directement sur la croissance des végétaux. Par conséquent, une augmentation de l'humidité est un bon marqueur de la disponibilité prochaine de ressources végétales (Hodek 2003; Tauber *et al.* 1998).

### I.2.3. Les différents types de diapause

Il est difficile de faire une seule typologie des diapauses en raison de la complexité et de la variété des stratégies observées.

On parle de *diapause facultative* quand le déclenchement de la diapause est optionnel, dépendant de facteurs environnementaux, par opposition à la *diapause obligatoire* qui est une composante fixe du programme de développement de l'insecte et pour laquelle il n'y a pas besoin de signaux inducteurs (Denlinger 2002; Kostál 2011). La diapause obligatoire est moins fréquente que la diapause facultative (Kostál 2011). La diapause facultative permet aux insectes d'augmenter significativement leur fitness quand les conditions sont favorables ou d'entrer en diapause quand les conditions sont défavorables (Hunter & McNeil 1997). La stratégie de diapause facultative est souvent décrite pour des espèces évoluant dans des

habitats aux saisons peu prévisibles, et elle semble être un point commun des insectes vivant dans des environnements qui favorisent le multivoltinisme (Hunter & McNeil 1997)

En fonction de leur durée, les diapauses peuvent être classées en quatre types. La *simple diapause* dure seulement une « mauvaise saison » : dès le retour des conditions favorables, l'ensemble des individus émergent (Mahdjoub & Menu 2008; Roux *et al.* 1997). Les diapauses d'une durée supérieure à un an sont regroupées sous le terme « diapause prolongée ». On distingue la *fixed prolonged diapause* pour laquelle plusieurs génotypes ont une « durée de diapause fixe » existent c'est-à-dire que pour une même population, il existe plusieurs génotypes, chacun déterminant la durée de la diapause (un, deux, trois ans...) (Menu 1993). Le troisième type de diapause est la *risk-spreading diapause* (ou *bet-hedging*). Cette notion a été développée à l'origine pour les plantes annuelles (Cohen 1966). Elle suppose que tous les individus n'émergent pas lors de la 1<sup>ère</sup> année, c'est-à-dire lors de la première apparition des conditions favorables mais émergent lors d'une année ultérieure, lors du retour pour la n<sup>ième</sup> fois de ces mêmes conditions favorables. La durée de la diapause n'est pas fixée par un génotype. Chez les insectes, ce type de diapause est observé chez le balanin des châtaignes *Curculio elephas* (Gyllenhal) (Soula & Menu 2003). Quatrièmement, pour la *predictive diapause*, la durée de la diapause dépend de signaux perçus avant l'entrée en diapause tels que la présence de composés chimiques de la plante-hôte ou le stress hydrique de la plante. Ces signaux permettent à l'individu d'anticiper l'état de la ressource (plante-hôte) dans le futur. Le pourcentage de larves entrant en diapause prolongée de *Lasiomma melania* Ackland (Diptera : Anthomyiidae) et de *Megastigmus spermatrophus* Wachtl (Hymenoptera: Torymidae) est inversement relié à la quantité de ressource disponible l'année suivante (Roques 1989; Roux *et al.* 1997).

Par ailleurs, les diapauses prolongées (d'une durée supérieure à une année) sont des phénomènes répandus (Hanski 1988) en particulier chez les espèces vivant dans des milieux où la saison favorable au développement est courte et imprévisible, chez les espèces subtropicales avec des saisons liées à des pluies imprévisibles, chez les espèces associées aux fleurs, aux graines et fruits d'une plante-hôte dont ces états ne sont pas d'une abondance régulière d'une année sur l'autre. La durée de la diapause peut varier en fonction de l'imprévisibilité du milieu (Menu & Debouzie 1993). Par ailleurs, elle peut influencer la capacité invasive des espèces (Mahdjoub & Menu 2008). L'hétérogénéité des réponses (dépendantes de facteurs environnementaux ou stochastiques) est importante, particulièrement dans les environnements peu prévisibles.

### **I.3. Les cécidomyies, une famille liée aux plantes**

D'après Gagné (2010), les Cecidomyiidae forment la plus importante famille de l'ordre des Diptères, avec plus de 6100 espèces. Elle appartient au sous-ordre des Nematocères et existe depuis au moins le Jurassique. Elle a connu une diversification

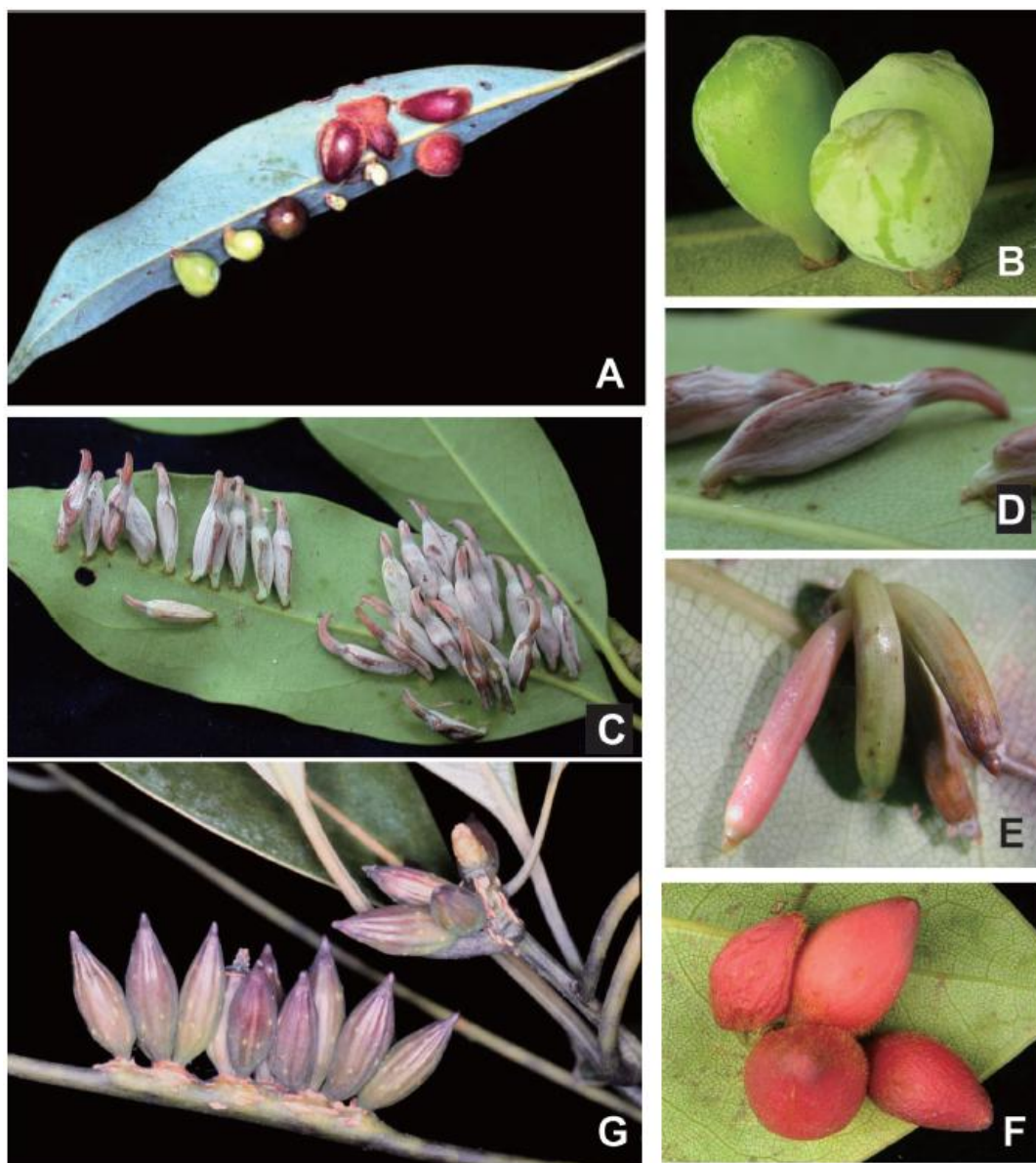
importante au Crétacé, concomitante de l'apparition des plantes à fleurs. Les cécidomyies sont présentes dans le monde entier. Leur nom anglais *gall midge* se rapporte à la faculté de nombreuses espèces d'induire des galles sur les végétaux attaqués. Cette famille constitue d'ailleurs le plus grand groupe d'insectes gallicoles. Environ 70% des espèces de cette famille induisent des galles. La plupart sont sténophages, quelques espèces seulement sont connues pour utiliser en même temps ou au cours de leur cycle des plantes pouvant appartenir à différentes espèces. Enfin, cette famille comprend également des espèces mycophages, prédatrices ou phytophages sans induction de galles. En raison de leur diversité et de leur longue évolution avec les plantes, les Cecidomyiidae apparaissent comme une famille particulièrement intéressante pour l'étude des relations entre les insectes et les plantes.

Les Cecidomyiidae sont divisées en cinq sous-familles (Gagné 2010). Les Cecidomyiinae constituent la sous-famille la plus récente, la plus importante et la plus diversifiée, avec plus de 4700 espèces décrites. C'est un groupe monophylétique qui est divisé en quatre super-tribus. Les Stomatosematidi et les Brachineuridi regroupent peu d'espèces et leur biologie est peu connue. Les Cecidomyiidi et les Lasiopteridi sont les mieux connues et les plus diversifiées. Ces deux tribus regroupent entre autres les espèces phytophages.

### I.3.1. Biologie

D'après Gagné (1994), les femelles émergent généralement avec leurs œufs pleinement matures et s'accouplent directement avec les mâles qui les attendent sur la plante-hôte ou sur le sol. La durée de vie des adultes est de seulement quelques jours. Le sex ratio parmi les adultes émergents est souvent déséquilibré en faveur des femelles. La monogénie est présente chez certaines espèces, c'est-à-dire que toute la progéniture d'une femelle est soit mâle, soit femelle (Tabadkani *et al.* 2011). Les femelles non fécondées attirent les mâles grâce à des phéromones sexuelles qui ont été identifiées et synthétisées chez la cécidomyie du pois, *Contarinia pisi* (Winnertz) (Hillbur *et al.* 1999; Hillbur *et al.* 2000). Les femelles fécondées recherchent immédiatement la plante-hôte pour commencer l'oviposition (Gagné 1994). Leur dispersion est fortement influencée par le vent (Kolesik 2000; Sylvén 1970). Mais elles sont aussi guidées par des composés émis par les plantes-hôtes, comme dans le cas de la cécidomyie des feuilles du manguier, *Procontarinia matteiana* Kieffer & Cecconi (Augustyn *et al.* 2010a; Augustyn *et al.* 2010b). Le choix des sites de ponte et le nombre d'œufs pondus peuvent être influencés par les substances volatiles émises par la plante-hôte (Gharalari *et al.* 2011). Chez la plupart des cécidomyies phytophages, les œufs sont pondus en surface des plantes ou entre les écailles des bourgeons ou sur les feuilles. Selon les espèces, les œufs sont pondus soit individuellement soit en groupe (Tabuchi & Amano 2006). Certaines espèces pondent leurs œufs à la surface des plantes. Les larves du premier stade rampent alors jusqu'à un site adéquat d'alimentation (à la surface ou à l'intérieur des tissus végétaux). Les larves issues d'œufs pondus dans les tissus peuvent directement commencer à se nourrir. Selon les espèces, les larves peuvent soit vivre librement à la surface les tissus végétaux (sans former de

galles), soit vivre à l'intérieur des tissus végétaux en formant des galles dans la plupart des cas. A la fin de la phase d'alimentation, certaines des espèces de cécidomyies gallicoles restent dans la plante-hôte, mais d'autres se forcent un passage jusqu'à l'extérieur de la galle pour rejoindre le sol (Gagné 1994). Une fois au sol, les larves se déplacent jusqu'à un site adapté en rampant, sautant ou creusant le sol. La pupaison au sol est un caractère ancestral et les larves de ces espèces ont toujours une spatula<sup>2</sup>. La pupaison achevée à l'intérieur d'un cocon, l'adulte remonte jusqu'à la surface du sol.



Chap. I - Figure 2 : Différentes galles provoquées par *Daphnephila* spp. sur *Machilus thunbergii* (Laurales : Lauraceae) à Taiwan. La forme et l'emplacement des galles (sur ou sous la feuille, sur la tige) changent en fonction des espèces. Source : Tokuda et al. 2008

<sup>2</sup> Structure cutanée, sclérosée et pigmentée située sur la face ventrale du prothorax des larves de Cecidomyiidae Gagné RJ (1994).



### I.3.1. Les galles, une caractéristique des cécidomyies

Les cécidomyies constituent la famille comptant le plus d'espèces induisant des galles. Toutefois, des espèces phytophages d'autres familles peuvent induire des galles dans les plantes suite à une réaction de la plante à la ponte : Cecidosidae et Tortricidae (Lepidoptera), Cynipidae et Tenthredinidae (Hymenoptera), Fordinae (Homoptera), Psyllidae (Hemiptera)... Les galles proviennent d'une croissance anormale des tissus végétaux due à des stimulations physiques et/ou des sécrétions chimiques d'un organisme (insecte, acarien, nématode, bactérie, champignon...) (Mapes 2008). Chaque organisme induit des galles spécifiques, d'un point de vue anatomique et physiologique (Figure 2). L'induction de galles est considérée comme la relation la plus complexe existant entre les insectes et les plantes, tous les mécanismes entrant en jeu ne sont pas encore compris (Shorthouse *et al.* 2005). Cette relation met parfois en jeu des associations symbiotiques avec des champignons (Heath & Stireman 2010). Les galles atteignent souvent leur taille définitive dès le premier stade larvaire mais elles cessent de se développer si les larves meurent (Gagné 1994). Les galles assurent aux insectes une protection physique vis-à-vis du milieu extérieur (température et humidité tamponnées), une protection contre les ennemis naturels (prédateurs généralistes principalement) et une ressource alimentaire (cellules surabondantes servant de nourriture, détournement des flux de sève du phloème/xylème) (Danks 2002).

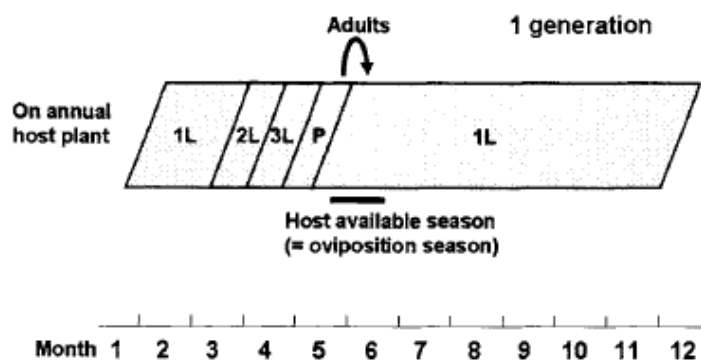
### I.3.2. La synchronisation des cycles de vie

La synchronisation des cycles entre les cécidomyies et leur plante-hôte est primordiale à cause de leur courte durée de vie (Ikai & Hijii 2006; Yukawa 2000). Plusieurs descriptions de la synchronisation des cécidomyies avec leur ressource sont rapportées dans la littérature. Par exemple, Yukawa (2000) détermine quatre schémas de synchronisation entre les cécidomyies et leurs plantes hôtes. Il prend en compte à la fois la durée des émergences (groupées vs. étalées) et la durée de disponibilité de la ressource (longue vs. courte). Le premier schéma combine des émergences groupées avec une disponibilité temporelle de la ressource courte. Ce schéma s'applique aux régions ayant une saison favorable très courte (montagnes ou régions boréales). A l'opposé, le quatrième schéma de synchronisation combine des émergences étalées dans le temps avec une longue disponibilité de la ressource. Généralement, les espèces de Cecidomyiidae associées avec des arbres sont univoltines tandis que les espèces associées aux plantes arbustives ou herbacées sont bivoltines ou multivoltines grâce à la présence continue de tissus favorables (Yukawa 2000).

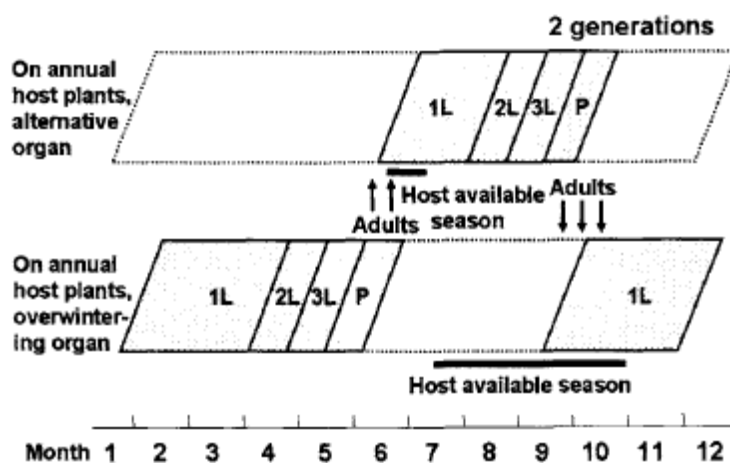
Les espèces japonaises du genre *Asphondylia* sont classées en cinq groupes par Uechi et Yukawa (2006). Ils prennent en compte les traits de vie des cécidomyies et leur diversité d'hôte. Un des groupes comprend les espèces bivoltines qui réalisent leur cycle annuel sur une seule plante-hôte mais en alternant différents organes (Figure 3).

Par ailleurs, les générations peuvent se succéder très rapidement, surtout sous les tropiques si la plante hôte croît en continu (Stiling *et al.* 1992). Par exemple, Freeman et Geoghagen (1989) estiment que *Asphondylia boerhaaviae* (Mohn) peut avoir 17 générations par an en Jamaïque sur trois espèces de plantes de la famille des Nyctaginaceae.

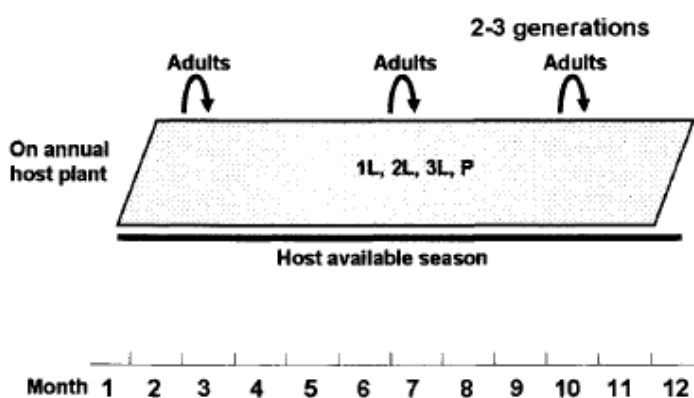
#### Groupe I



#### Groupe II



#### Groupe III



Chap. I - Figure 3 : Représentation schématique de trois histoires de vie des espèces du genre *Asphondylia* au Japon en fonction de la disponibilité de leur plante-hôte. En haut (Groupe I), les espèces monovoltines et monophage réalisent leur cycle sur une seule plante-hôte. Au milieu (Groupe II), les espèces bivoltines réalisent leur cycle sur une seule plante-hôte en alternant entre différents organes de cette plante-hôte.



En bas (Groupe III), les espèces multivoltines réalisent leur cycle sur un organe d'une seule plante-hôte disponible toute l'année. *Source* : Uechi et Yukawa, 2006

### I.3.3. La diapause chez les cécidomyies

Chez les cécidomyies, la diapause se déroule durant le troisième et dernier stade larvaire et quelquefois lors de la phase pupale (Danks 1987). Pour les espèces multivoltines, la dormance peut apparaître seulement à la dernière génération quand la plante stoppe sa production de nouveaux organes (Isidoro & Lucchi 1989), ou elle peut avoir lieu pour une partie de la population à chaque génération (Coutin 1959). La fréquence des larves en diapause augmente avec la succession des générations au cours de la saison (Readshaw 1966; Vallotton 1969). La diapause de certaines espèces est connue pour durer de quelques années jusqu'à plus de dix ans pour *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Danks 1987). La première génération d'une nouvelle saison végétale peut être composite c'est-à-dire constituée non seulement d'individus de la dernière génération de la saison précédente mais aussi d'individus diapausants de générations antérieures (Barnes 1956). Ainsi, une partie de la population de la cécidomyie des bambous *Hasegawaia sasacola* Mozen rentre en diapause prolongée. Cet état la protège de la variabilité interannuelle de la production de bourgeons, le bambou ne fleurissant de manière synchronisée que tous les 10 ou 20 ans (Sunose 1978). La diapause prolongée est donc une assurance contre une possible élimination de l'ensemble d'une population lors d'une année défavorable.

### I.3.4. Espèces d'importance économique agricole et méthodes de lutte

Les caractéristiques biologiques et comportementales, telles que la fécondité, le régime alimentaire des larves ou le nombre de générations, permettent à certaines espèces d'être des ravageurs des cultures tandis que d'autres espèces, pourtant proches, ne le sont pas (Schoonhoven *et al.* 2005). Plusieurs cécidomyies sont ainsi des ravageurs des grandes cultures, des cultures maraichères, ornementales ou forestières. L'une des espèces les plus connues est la mouche de Hesse, *Mayetiola destructor* (Say), dont la larve se développe sur les tiges de blé, tuant les plantes et réduisant fortement le rendement (Stuart *et al.* 2008). Cette espèce a été probablement introduite d'Europe en Amérique du Nord par les mercenaires allemands (*Hessian soldiers*) durant la guerre d'indépendance américaine (Johnson *et al.* 2004; Stuart *et al.* 2008). La cécidomyie du sorgho, *Contarinia sorghicola* (Coquillett), également introduite en Amérique du Nord, est l'un des plus importants ravageurs des céréales au monde (Franzmann 1996). Les cécidomyies du genre *Orseolia* se développant sur les bourgeons et les tiges de riz sont également des ravageurs majeurs, *O. oryzivora* Harris

and Gagne en Afrique (Omoloye & Odebiyi 2001) et *O. oryzae* (Wood-Mason) en Asie (Bentur *et al.* 2008).

Le contrôle des populations de cécidomyies peut être assuré par des traitements insecticides pulvérisés sur les plantes, appliqués au sol ou sur les denrées stockées (Wu *et al.* 2006). Mais leur efficacité est souvent limitée (Barbosa *et al.* 2002). Par ailleurs, ces traitements ont des conséquences environnementales importantes. En milieu naturel, les prédateurs d'insectes phytophages et la résistance des plantes-hôtes sont deux facteurs dominants contrôlant les populations (Schoonhoven *et al.* 2005). Ces approches constituent les pistes de recherche pour contrôler à long terme les populations de cécidomyies. La connaissance des biotypes de la mouche de Hesse et les résistances associées des variétés de blé permettent de proposer une solution efficace adaptée à chaque région de culture (Bouhssini *et al.* 2001; Williams *et al.* 2003). Les pratiques culturales peuvent également jouer un rôle dans le contrôle des populations de cécidomyies. Le paillage ou l'enherbement peuvent avoir des effets bénéfiques sur les populations de prédateurs (Mathews *et al.* 2002). Contre la cécidomyie des lentilles, il est conseillé, dans la rotation des cultures, de semer les nouveaux champs en « remontant » le vent dominant (Kolesik 2000). Aujourd'hui, une nouvelle piste pour le contrôle des populations est l'accroissement de la biodiversité végétale au sein des agro-écosystèmes qui vise à favoriser les régulations naturelles (Ratnadass *et al.* 2012).

Il existe cependant des espèces de cécidomyies bénéfiques pour l'agriculture. Les larves d'une cécidomyie prédatrice, *Aphidoletes aphidimyza* (Rondani), sont un agent de contrôle biologique de pucerons (Meadow *et al.* 1985). Quelques espèces de cécidomyies phytophages sont également utilisées avec succès pour contrôler des pestes végétales. La cécidomyie des fleurs *Dasineura dielsi* Rübsaamen a été introduite en Afrique du Sud dans le cadre d'une lutte biologique contre un acacia australien invasif *Acacia cyclops* A. Cunn. ex G. Don (Adair 2005).

### Références bibliographiques

- Adair RJ (2005) The biology of *Dasineura dielsi* Rübsaamen (Diptera : Cecidomyiidae) in relation to the biological control of *Acacia cyclops* (Mimosaceae) in South Africa. *Australian Journal of Entomology* **44**, 446-456.
- Anstead JA, Mallet J, Denholm I (2007) Temporal and spatial incidence of alleles conferring knockdown resistance to pyrethroids in the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), and their association with other insecticide resistance mechanisms. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 243-252.
- Augustyn WA, Botha BM, Combrinck S, Du Plooy W (2010a) Correlation of volatile profiles of twenty mango cultivars with their susceptibilities to mango gall fly infestation. *South African Journal of Botany* **76**, 710-716.
- Augustyn WA, Botha BM, Combrinck S, Maree JE, du Plooy GW (2010b) Effect of secondary metabolites on gall fly infestation of mango leaves. *Flavour and Fragrance Journal* **25**, 223-229.

- Barber NA (2010) Light Environment and Leaf Characteristics Affect Distribution of *Corythuca arcuata* (Hemiptera: Tingidae). *Environmental Entomology* **39**, 492-497.
- Barbosa FR, Gonçalves ME, De Souza EA, *et al.* (2002) Chemical control of *Erosomyia mangiferae* on mango trees at the sao francisco river valley, Brazil. *Annals of the VII International Mango Symposium*, 261-261.
- Barnes HF (1956) *Gall Midges of economic Importance. Vol. VII. Gall Midges of Cereal Crops.*, London: Lockwood. 261pp.
- Bentur JS, Cheralu C, Rao PRM (2008) Monitoring virulence in Asian rice gall midge populations in India. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **129**, 96-106.
- Bernays E, Graham M (1988) On the Evolution of Host Specificity in Phytophagous Arthropods. *Ecology* **69**, 886-892.
- Bernays EA, Chapman RF (1994) *Host-plant selection by phytophagous insects*, New York. 312pp.
- Bouhssini ME, Hatchett JH, Cox TS, Wilde GE (2001) Genotypic interaction between resistance genes in wheat and virulence genes in the Hessian fly *Mayetiola destructor* (Diptera: Cecidomyiidae). *Bulletin of Entomological Research* **91**, 327-331.
- Burke S, Pullin AS, Wilson RJ, Thomas CD (2005) Selection for discontinuous life-history traits along a continuous thermal gradient in the butterfly *Aricia agestis*. *Ecological Entomology* **30**, 613-619.
- Cates RG (1980) Feeding patterns of monophagous, oligophagous, and polyphagous insect herbivores: The effect of resource abundance and plant chemistry. *Oecologia* **46**, 22-31.
- Charlat S, Hurst GDD, Merçot H (2003) Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics* **19**, 217-223.
- Cohen D (1966) Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *Journal of Theoretical Biology* **12**, 119-129.
- Coutin R (1959) Quelques particularités du cycle évolutif des cécidomyies. La diapause prolongée des larves et l'apparition différée des imagos. *Ann. Epiphytes* **4**, 491-500.
- Damos PT, Savopoulou-Soultani M (2010) Synchronized diapause termination of the peach twig borer *Anarsia lineatella* (Lepidoptera: Gelechiidae): Brownian motion with drift? *Physiological Entomology* **35**, 64-75.
- Danks HV (1987) *Insect Dormancy: an Ecological Perspective* Biological Survey of Canada.
- Danks HV (2002) Modification of adverse conditions by insects. *Oikos* **99**, 10-24.
- Danks HV (2007) The elements of seasonal adaptations in insects. *Entomological Society of Canada* **139**, 1-44.
- Denholm I, Devine GJ, Williamson MS (2002) Insecticide Resistance on the Move. *Science* **297**, 2222-2223.
- Denlinger DL (1986) Dormancy in tropical insects. *Annual Review of Entomology* **31**, 239-264.
- Denlinger DL (2002) Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* **47**, 93-122.
- Denno RF, McClure MS, Ott JR (1995) Interspecific Interactions in Phytophagous Insects: Competition Reexamined and Resurrected. *Annual Review of Entomology* **40**, 297-331.

- Ehrlich PR, Raven PH (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* **18**, 586-608.
- Ellwood E, Diez J, Ibáñez I, *et al.* (2012) Disentangling the paradox of insect phenology: are temporal trends reflecting the response to warming? *Oecologia* **168**, 1161-1171.
- Feder JL, Chilcote CA, Bush GL (1990a) The geographic pattern of genetic differentiation between host associated populations of *Rhagoletis pomonella* (Diptera : Tephritidae) in the eastern United States and Canada. *Evolution* **44**, 570-594.
- Feder JL, Chilcote CA, Bush GL (1990b) Regional, local and microgeographic allele frequency variation between apple and hawthorn populations of *Rhagoletis pomonella* in western michigan. *Evolution* **44**, 595-608.
- Feeny P (1968) Effect of oak leaf tannins on larval growth of the winter moth *Operophtera brumata*. *Journal of Insect Physiology* **14**, 805-817.
- Finch S, Collier RH (2000) Host-plant selection by insects - a theory based on 'appropriate/inappropriate landings' by pest insects of cruciferous plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **96**, 91-102.
- Franzmann BA (1996) Evaluation of a Laboratory Bioassay for Determining Resistance Levels to Sorghum Midge *Contarinia sorghicola* (Coquillett) (Diptera: Cecidomyiidae) in Grain Sorghum. *Australian Journal of Entomology* **35**, 123.
- Freeman BE, Geoghagen A (1989) A population study in Jamaica on the gall-midge *Asphondylia boerhaaviae*: A contribution to spatial dynamics. *Journal of Animal Ecology* **58**, 367-382.
- Frey JE, Bush GL (1990) *Rhagoletis* sibling species and host races differ in host odor recognition. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **57**, 123-131.
- Gagné RJ (1994) *The gall midges of neotropical region* Cornell University Press, New York, USA. 352pp.
- Gagné RJ (2010) Update for a catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Digital version1.  
[http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne\\_2010\\_World\\_Catalog\\_Cecidomyiidae.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12754100/Gagne_2010_World_Catalog_Cecidomyiidae.pdf)
- Gharalari AH, Smith MAH, Fox SL, Lamb RJ (2011) Volatile compounds from non-preferred wheat spikes reduce oviposition by *Sitodiplosis mosellana*. *Canadian Entomologist* **143**, 388-391.
- Hanski I (1988) Four kinds of extra long diapause in insects: A review of theory and observation. *Ann. Zool. Fennici* **25**, 37-53.
- He H-M, Xian Z-H, Huang F, Liu X-P, Xue F-S (2009) Photoperiodism of diapause induction in *Thyrassia penangae* (Lepidoptera: Zygaenidae). *Journal of Insect Physiology* **55**, 1003-1008.
- He XZ, Wang Q (2012) Laboratory induction and termination of aestivation in *Platygaster demades* Walker, an important parasitoid of *Dasineura mali* Kieffer. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **40**, 65-71.
- Heath JJ, Stireman JO, III (2010) Dissecting the association between a gall midge, *Asteromyia carbonifera*, and its symbiotic fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **137**, 36-49.
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? : a statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters* **281**, 6.

- Hillbur Y, Anderson P, Arn H, Bengtsson M, Lofqvist J (1999) Identification of sex pheromone components of the tea midge, *Contarinia pisi* (Diptera:Cecidomyiidae). *Naturwissenschaften* **86**, 292-294.
- Hillbur Y, El-Sayed A, Bengtsson M, *et al.* (2000) Laboratory and field study of the attraction of male pea midges, *Contarinia pisi*, to synthetic sex pheromone components. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 1941-1952.
- Hodek I (2002) Controversial aspects of diapause development. *European Journal of Entomology* **99**, 163-173.
- Hodek I (2003) Role of water and moisture in diapause development (A review). *European Journal of Entomology* **100**, 223-232.
- Hunter AF, Elkinton JS (2000) Effects of synchrony with host plant on populations of a spring-feeding lepidopteran. *Ecology* **81**, 1248-1261.
- Hunter MD, McNeil JN (1997) Host-plant quality influences diapause and voltinism in a polyphagous insect herbivore. *Ecology* **78**, 977-986.
- Ikai N, Hijii N (2006) Effects of Host-tree Traits on the Species Composition and Density of Gall-ing Insects on two Oak Species, *Quercus crispula* and *Quercus serrata* (Fagaceae). In: *Galling Arthropods and Their Associates*, pp. 209-216.
- Ishihara M, Ohgushi T (2006) Reproductive inactivity and prolonged developmental time induced by seasonal decline in host plant quality in the willow leaf beetle *Plagioder a versicolora* (Coleoptera : Chrysomelidae). *Environmental Entomology* **35**, 524-530.
- Isidoro N, Lucchi A (1989) Eggshell fine morphology of *Allocontarinia sorghicola* Coq (Diptera: Cecidomyiidae). *Entomologica Bari* **24**.
- Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, Liu Y, Zhang L (2010) Diapause termination, post-diapause development and reproduction in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology* **56**, 1325-1331.
- Johnson AJ, Schemerhorn BJ, Shukle RH (2004) A First Assessment of Mitochondrial DNA Variation and Geographic Distribution of Haplotypes in Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae). *Annals of the Entomological Society of America* **97**, 940-948.
- Knight A, Brower LP (2009) The Influence of Eastern North American Autumnal Migrant Monarch Butterflies (*Danaus plexippus* L.) on Continuously Breeding Resident Monarch Populations in Southern Florida. *Journal of Chemical Ecology* **35**, 816-823.
- Kolesik P (2000) Distribution of infestation by lentil gall midge *Contarinia lentis* (Dipt., Cecidomyiidae) in lentil fields: statistical model. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* **124**, 7-10.
- Kostal V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* **52**, 113-127.
- Kostál V (2011) Insect photoperiodic calendar and circadian clock: Independence, cooperation, or unity? *Journal of Insect Physiology* **57**, 538-556.
- Kurban A, Yoshida H, Izumi Y, Sonoda S, Tsumuki H (2007) Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): sensitive stage for thermal induction in the Okayama (western Japan) population. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 219-223.
- Lin CP, Wood TK (2002) Molecular Phylogeny of the North American *Enchenopa binotata* (Homoptera: Membracidae) Species Complex. *Annals of the Entomological Society of America* **95**, 162-171.

- Lindström J, Kaila L, Niemelä P (1994) Polyphagy and adult body size in geometrid moths. *Oecologia* **98**, 130-132.
- Loxdale HD (2010) Rapid genetic changes in natural insect populations. *Ecological Entomology* **35**, 155-164.
- Mahdjoub T, Menu F (2008) Prolonged diapause: A trait increasing invasion speed? *Journal of Theoretical Biology* **251**, 317-330.
- Mapes C (2008) Gall formation. In: *Encyclopedia of Entomology* (ed. Capinera JL), pp. 1572-1576. Springer Science, Dordrecht, The Netherlands.
- Masante-Roca I, Anton S, Delbac L, Dufour M-C, Gadenne C (2007) Attraction of the grapevine moth to host and non-host plant parts in the wind tunnel: effects of plant phenology, sex, and mating status. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **122**, 239-245.
- Mathews CR, Bottrell DG, Brown MW (2002) A comparison of conventional and alternative understory management practices for apple production: multi-trophic effects. *Applied Soil Ecology* **21**, 221-231.
- Meadow R, Kelly W, Shelton A (1985) Evaluation of *Aphidoletes aphidimyza* [Dip.: Cecidomyiidae] for control of *Myzus persicae* [Hom.: Aphididae] in greenhouse and field experiments in the United States. *Biocontrol* **30**, 385-392.
- Menu F (1993) Strategies of emergence in the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae). *Oecologia* **96**, 383-390.
- Menu F, Debouzie D (1993) Coin-flipping plasticity and prolonged diapause in insects - example of the chestnut weevil *Curculio elephas* (Coleoptera, Curculionidae). *Oecologia* **93**, 367-373.
- Mironidis GK, Savopoulou-Soultani M (2012) Effects of constant and changing temperature conditions on diapause induction in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research* **102**, 139-147.
- Mitton JB, Ferrenberg SM (2012) Mountain Pine Beetle Develops an Unprecedented Summer Generation in Response to Climate Warming. *American Naturalist* **179**, E163-E171.
- Mopper S (1996) Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* **11**, 235-238.
- Morris WF, Kareiva PM (1991) How insect herbivores find suitable host plants: the interplay between random and nonrandom movement. In: *Insect-plant interactions* (ed. Bernays EA), pp. 175-208. CRC Press, Boca Raton.
- Novotny V, Basset Y (1999) Body size and host plant specialization: a relationship from a community of herbivorous insects on Ficus from Papua New Guinea. *Journal of tropical ecology* **15**, 315-328
- Omoloye AA, Odebiyi JA (2001) Endogenously entrained emergence and oviposition rhythm in the African rice gall midge, *Orseolia oryzivora* H. and G. (Dipt., Cecidomyiidae). *Journal of Applied Entomology* **125**, 105-107.
- Piironen S, Ketola T, Lyytinen A, Lindstrom L (2011) Energy use, diapause behaviour and northern range expansion potential in the invasive Colorado potato beetle. *Functional Ecology* **25**, 527-536.
- Price PW, Martinsen GD (1994) Biological pest control. *Biomass and Bioenergy* **6**, 93-101.
- Rajon E, Venner S, Menu F (2009) Spatially heterogeneous stochasticity and the adaptive diversification of dormancy. *Journal of Evolutionary Biology* **22**, 2094-2103.

- Ratnadass A, Fernandes P, Avelino J, Habib R (2012) Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 273-303.
- Readshaw JL (1966) The ecology of the swede midge, *Contarinia nasturtii* (Kieff.) (Diptera, Cecidomyiidae). I.—Life-history and influence of temperature and moisture on development. *Bulletin of Entomological Research* **56**, 685-700.
- Reznik SY, Vaghina NP, Voinovich ND (2012) Multigenerational maternal effect on diapause induction in *Trichogramma species* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Biocontrol Science and Technology* **22**, 429-445.
- Rinehart JP, Robich RM, Denlinger DL (2006) Enhanced Cold and Desiccation Tolerance in Diapausing Adults of *Culex pipiens*, and a Role for Hsp70 in Response to Cold Shock but Not as a Component of the Diapause Program. *Journal of Medical Entomology* **43**, 713-722.
- Roberts RM (1978) Seasonal strategies in Insects. *The New Zealand Entomologist* **6**, 350-356.
- Roderick GK (1996) Geographic structure insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology* **41**, 325-352.
- Roques A (1989) New results and some thinking about significance and induction of prolonged diapause in cone insects with particular reference to the larch cone fly (*Lasiomma melania*) and to the Douglas-fir seed chalcid (*Megastigmus spermotrophus*). *Proceedings of the 3rd Cone and Seed Insects Working Party Conference, held in Victoria, British Columbia, Canada, on 26-30 June 1988* pp.64-81 Pacific Forestry Centre, Forestry Canada, Victoria, British Columbia, Canada.
- Roux G, Roques A, Menu F (1997) Effect of temperature and photoperiod on diapause development in a Douglas fir seed chalcid, *Megastigmus spermotrophus*. *Oecologia* **111**, 172-177.
- Rowellrahier M (1992) Genetic-structure of leaf-beetles populations - Microgeographic and sexual differentiation in *Oreina cacaliae* and *O. speciosissima*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **65**, 247-257.
- Saulich A (2010) Long life cycles in insects. *Entomological Review* **90**, 1127-1152.
- Saunders DS (2011) Unity and diversity in the insect photoperiodic mechanism. *Entomological Science* **14**, 235-244.
- Saunders DS (2012) Insect photoperiodism: seeing the light. *Physiological Entomology* **37**, 207-218.
- Saunders DS (2013) Insect photoperiodism: Measuring the night. *Journal of Insect Physiology* **59**, 1-10.
- Sausen CD, Sant'Ana J, Redaelli LR, Pires PDS (2011) Diapause Initiation and Alterations in the Life Cycle of *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) as Induced by Photoperiodic Conditions. *Neotropical Entomology* **40**, 529-532.
- Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-Plant Biology*, Second edn. 421pp.
- Scriber JM (2002) Evolution of insect-plant relationships: chemical constraints, coadaptation, and concordance of insect/plant traits. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **104**, 217-235.
- Shibata E (2001) Synchronization of shoot elongation in the bamboo *Phyllostachys heterocycla* (Monocotyledoneae : Gramineae) and emergence of the gall maker *Aiolomorphus rhopaloides* (Hymenoptera : Eurytomidae) and its inquiline *Diomorus aiolomorphi* (Hymenoptera : Torymidae). *Environmental Entomology* **30**, 1098-1102.

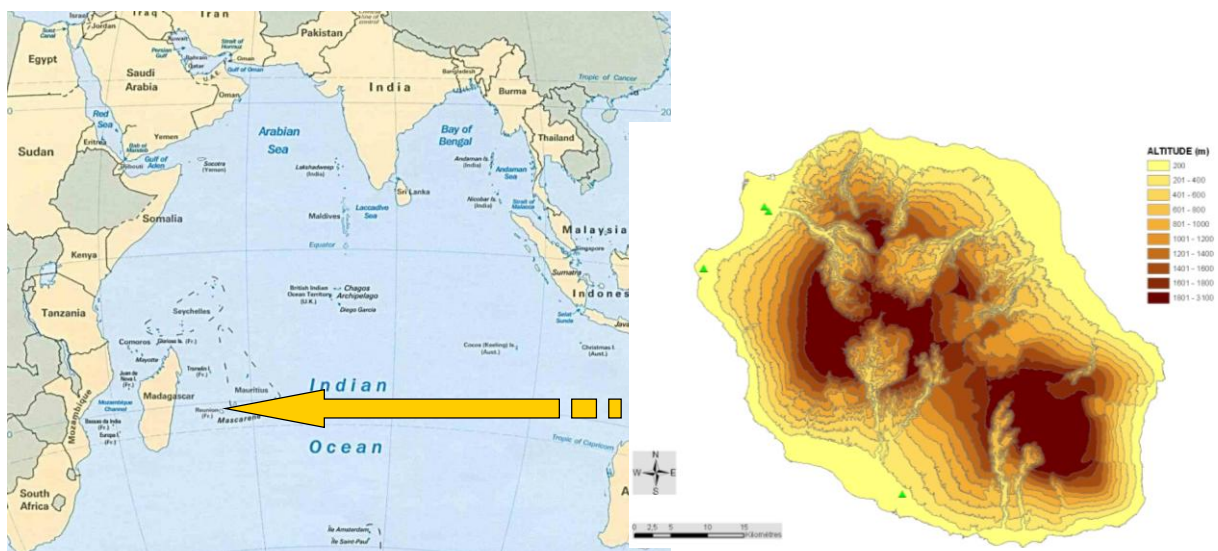


- Shintani Y, Hirose Y, Terao M (2011) Effects of temperature, photoperiod and soil humidity on induction of pseudopupal diapause in the bean blister beetle *Epicauta gorhami*. *Physiological Entomology* **36**, 14-20.
- Shorthouse JD, Wool D, Raman A (2005) Gall-inducing insects - Nature's most sophisticated herbivores. *Basic and Applied Ecology* **6**, 407-411.
- Singer MC, Parmesan C (2010) Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 3161-3176.
- Soula B, Menu F (2003) Variability in diapause duration in the chestnut weevil: mixed ESS, genetic polymorphism or bet-hedging? *Oikos* **100**, 574-580.
- Stiling P, Rossi AM, Strong DR, Johnson DM (1992) Life history and parasites of *Asphondylia borrichiae* (Diptera: Cecidomyiidae), a gall maker on *Borrichia frutescens*. *Florida Entomologist* **75**, 130-137.
- Stuart JJ, Chen MS, Harris MO (2008) Hessian Fly. In: *Genome Mapping and Genomics in Arthropods*, pp. 93-102. Springer Berlin Heidelberg.
- Sunose T (1978) Studies on extended diapause in *Hasegawaia sasacola* Mozen (Diptera : Cecidomyiidae) and its parasites. *Kontyu, Tokyo* **46**, 400-415.
- Sylvén E (1970) Field Movement of Radioactively Labelled Adults of *Dasyneura brassicae* Winn. (Dipt., Cecidomyiidae). *Entomologica Scandinavica* **1**, 161-187.
- Tabadkani SM, Khansefid M, Ashouri A (2011) Monogeny, a neglected mechanism of inbreeding avoidance in small populations of gall midges. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **140**, 77-84.
- Tabuchi K, Amano H (2006) Different Oviposition Strategies in Two Closely Related Gall Midges (Diptera: Cecidomyiidae): Aggregation versus Risk Spreading. In: *Galling Arthropods and Their Associates*, pp. 161-168.
- Takagi S, Miyashita T (2008) Host plant quality influences diapause induction of *Byasa alcinous* (Lepidoptera : Papilionidae). *Annals of the Entomological Society of America* **101**, 392-396.
- Tanaka S, Zhu D-H (2003) Presence of three diapauses in a subtropical cockroach: control mechanisms and adaptive significance. *Physiological Entomology* **28**, 323-330.
- Tauber MJ, Tauber CA (1976) Insect Seasonality: Diapause Maintenance, Termination, and Postdiapause Development. *Annual Review of Entomology* **21**, 81-107.
- Tauber MJ, Tauber CA, Nyrop JP, Villani MG (1998) Moisture, a vital but neglected factor in the seasonal ecology of insects: Hypotheses and tests of mechanisms. *Environmental Entomology* **27**, 523-530.
- Thierry M, Becker N, Hajri A, et al. (2011) Symbiont diversity and non-random hybridization among indigenous (Ms) and invasive (B) biotypes of *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology* **20**, 2172-2187.
- Tooker JF, Koenig WA, Hanks LM (2002) Altered host plant volatiles are proxies for sex pheromones in the gall wasp *Antistrophus rufus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 15486-15491.
- Uechi N, Yukawa J (2006) Life History Patterns and Host Ranges of the Genus *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae). In: *Galling Arthropods and Their Associates*, pp. 275-285. Springer, Tokyo, Japan.

- Vallotton R (1969) *Contribution à la biologie de la Cécidomyie du pois Contarinia pisi Winn: Diptera, Cecidomyiidae avec étude particulière du phénomène de la diapause.*
- Vinod KV, Sabu TK (2010) Dormancy-inducing factors of rubber litter beetle, *Luprops tristis* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Science* **17**, 47-51.
- Wang XP, Yang QS, Dalin P, *et al.* (2012) Geographic variation in photoperiodic diapause induction and diapause intensity in *Sericus montelus* (Lepidoptera: Papilionidae). *Insect Science* **19**, 295-302.
- Werner SM, Albers MA, Cryderman T, *et al.* (2006) Is the outbreak status of *Thrips calcaratus* Uzel in North America due to altered host relationships? *Forest Ecology and Management* **225**, 200-206.
- Williams CE, Collier CC, Sardesai N, Ohm HW, Cambron SE (2003) Phenotypic assessment and mapped markers for H31, a new wheat gene conferring resistance to Hessian fly (Diptera : Cecidomyiidae). *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 1516-1523.
- Wu QJ, Zhao JZ, Taylor AG, Shelton AM (2006) Evaluation of insecticides and application methods against *Contarinia nasturtii* (Diptera : Cecidomyiidae), a new invasive insect pest in the United States. *Journal of Economic Entomology* **99**, 117-122.
- Xia QW, Chen C, Tu XY, Yang HZ, Xue FS (2012) Inheritance of photoperiodic induction of larval diapause in the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Physiological Entomology* **37**, 185-191.
- Xiao HJ, Mou FC, Zhu XF, Xue FS (2010) Diapause induction, maintenance and termination in the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Walker). *Journal of Insect Physiology* **56**, 1558-1564.
- Yukawa J (2000) Synchronization of galls with host plant phenology. *Population Ecology* **42**, 105-113.

### II.1. La Réunion, une île subtropicale aux conditions très variées

La Réunion est une île volcanique située dans l'Océan Indien à 750 kilomètres à l'Est de Madagascar, par 55°30' de longitude Est et 21°05' de latitude Sud (Figure 1). Elle est la plus jeune île (2,1 Ma) de l'archipel des Mascareignes qui comprend l'île Maurice (200 km au Nord Est de la Réunion) et Rodrigues (800 km à l'Est). D'une superficie de 2 512 km<sup>2</sup>, la Réunion a une forme elliptique orientée NO-SE (petit axe 45 km, grand axe 72 km) (Oehler *et al.* 2008). Très montagneuse, elle est constituée de deux gros massifs individualisés : le Piton des Neiges (sommet culminant à 3 069 m, volcan inactif) et le Piton de la Fournaise (2 361 m, siège du volcanisme actif). Le centre du vieux massif est profondément éventré par des cirques mitoyens entourés de remparts sub-verticaux de 500 à 1 000 m de dénivelé (Raunet 1991). Les premières implantations humaines sur l'île datent du milieu du 17<sup>ème</sup> siècle.

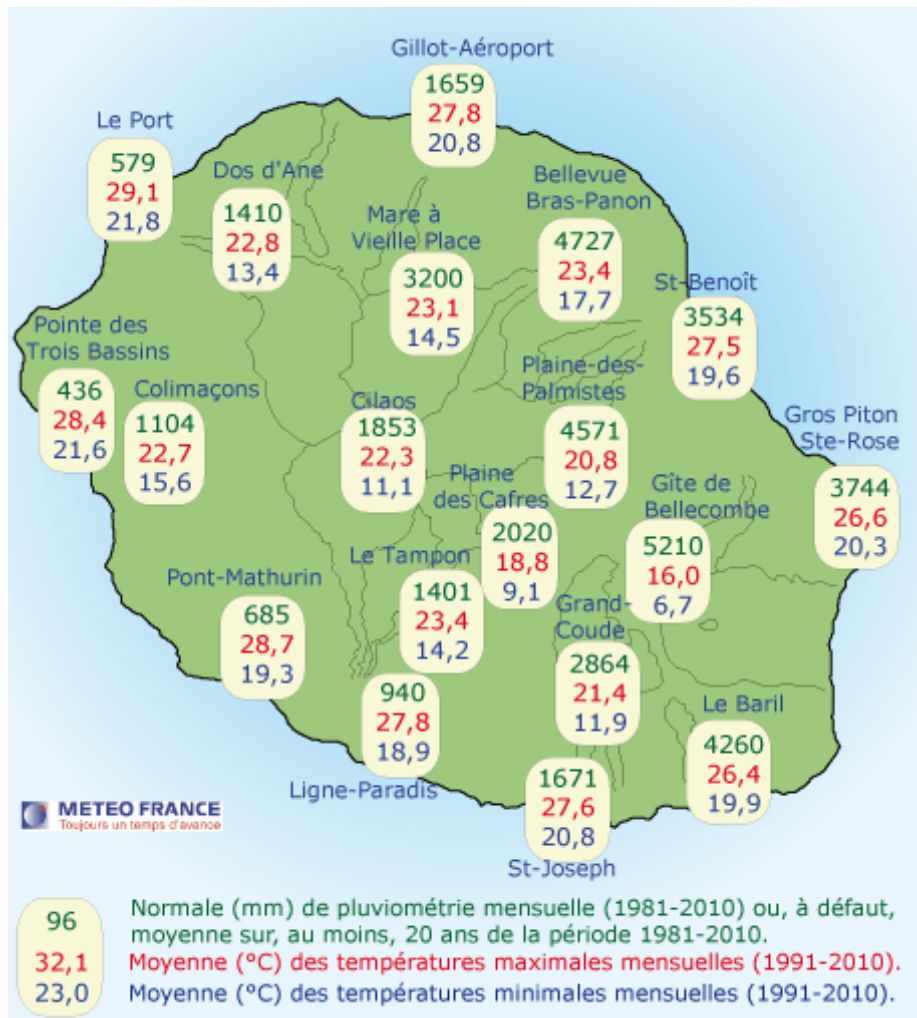


Chap. II - Figure 1: Localisation de l'île de la Réunion dans l'Océan Indien (à gauche) et carte du relief de l'île (à droite).

Son climat est marqué par trois caractéristiques majeures (Raunet 1991).

Premièrement, les gradients de pluviosité sont très forts, depuis 550 mm au Port (région Ouest) jusqu'à 9 000 mm à Takamaka (région Est) (Figure 2). Ils sont conditionnés par l'exposition aux alizés (face « au vent », face « sous le vent »), l'altitude et l'orographie. La limite entre les régions « au vent » et « sous le vent » coïncide à peu près avec l'isohyète moyenne annuelle de 2 000 mm de Gillot-Aéroport à Saint-Joseph. Sur la façade sous le vent, il y a deux saisons tranchées : la saison des pluies du 15 décembre au 15 avril avec plus de 100 à 300 mm par mois à l'exception du littoral et la saison sèche du 15 avril au 15 décembre,

avec moins de 100 mm mensuel. Les mois de juillet à octobre sont les plus secs avec moins de 50 mm mensuel. Sur la façade au vent, la moyenne annuelle est de 4 000 mm de pluie sur le littoral, mais peut localement atteindre les 9 000 mm à mi-pentes, avec une distinction entre une saison très pluvieuse et une saison moins pluvieuse.



Chap. II - Figure 2 : Normale de pluviométrie mensuelle de 1981 à 2010 et moyenne des températures maximales et minimales mensuelles pour 19 localités. *Source* : Météo France, 2012

Deuxièmement, il existe un fort gradient de température étroitement lié à l'altitude. Le gradient thermique est de  $-0,65^{\circ}\text{C}$  pour 100 mètres de dénivellation. La saison la plus chaude correspond aux mois de janvier à mars tandis que la saison la plus fraîche correspond aux mois de juillet à septembre. La forte influence océanique et la latitude relativement basse expliquent les températures moyennes relativement tempérées et d'assez faibles amplitudes (Figure 2). Jusqu'à 100 mètres d'altitude, les températures moyennes maximales varient entre  $27^{\circ}\text{C}$  et  $29,5^{\circ}\text{C}$  en été et les minimales entre  $17^{\circ}\text{C}$  et  $21^{\circ}\text{C}$  en hiver (Raunet 1991). La région

« sous le vent » est plus chaude de 1°C à 2°C que la région au vent. Dans les cirques, à altitudes semblables, la moyenne annuelle est plus élevée d'environ 1,5°C par rapport aux pentes externes.

Troisièmement, le climat de la Réunion est soumis à des périodes cycloniques. Les dépressions tropicales et cyclones prennent naissance pendant l'été austral dans la zone de convergence intertropicale. Sur l'ensemble des perturbations tropicales qui influencent la Réunion, près de 40%, au stade de vrai cyclone, abordent la Réunion par le NE en suivant une trajectoire NE-SO. Ils ont lieu entre janvier et mars. Pour conclure, les deux traits dominants de ce climat sont, d'une part un régime assez régulier d'alizés (vents d'est dominants), d'autre part un régime de perturbations tropicales parfois violentes (cyclones) plus irrégulier et difficilement prévisible.

Du fait de son relief et de son volcanisme actif, la Réunion dispose d'un espace agricole assez réduit. Seulement 17% de son territoire est dévolu à cette activité, ce qui représente une surface agricole utile (SAU) de 42 813 ha. La canne à sucre reste la culture majoritaire et occupe près de 52% de la SAU. Les cultures fruitières permanentes ne représentent que 4,5% de la SAU (Agreste 2012).

## **II.2. Le manguier, un fruitier d'importance mondiale en zone tropicale**

### **II.2.1. Origine, sélection et diffusion**

Le manguier, *Mangifera indica* L., appartient à la famille des Anacardiaceae. Selon Watson et Dallwitz (1992), cette famille comprend environ 600 espèces réparties en 70 genres. Ces arbres ou arbustes sont essentiellement localisés dans les régions tropicales et subtropicales, et dans une moindre mesure dans les régions tempérées. Les 69 espèces de *Mangifera* sont naturellement présentes dans les régions tropicales d'Asie du Sud-Est mais le cœur de la zone de distribution correspond à la péninsule de Malaisie, Bornéo et Sumatra, avec 29 espèces présentes (Bompard 1993).

Le manguier est un arbre pouvant atteindre 30 à 50 m de hauteur et vivre plus de 100 ans. Il semble originaire de la frontière ouest de la zone de distribution du genre *Mangifera* c'est-à-dire de la région Indo-Birmane. Le nom d'espèce '*indica*' fait plutôt référence à un des lieux de sélection et d'amélioration de cette espèce. En effet, le manguier a été domestiqué depuis au moins quatre millénaires en Inde où il compte actuellement plus de 1 000 variétés (de Candolle 1884; Mukerjee 1953). Toutefois, deux zones de domestication existent, l'une dans les régions subtropicales de l'Inde avec des variétés monoembryonnées et l'autre dans les régions tropicales du Sud-Est asiatique (Sud du Vietnam, Indonésie, Philippines) avec des variétés polyembryonnées (Vincenot & Normand 2009).

La culture du manguier s'est progressivement répandue à travers le monde dans les pays tropicaux et sub-tropicaux (Litz 2009). Elle a d'abord été diffusée en Asie en même

temps que les cultures hindouiste et bouddhiste se propageaient. Au 7<sup>ème</sup> siècle, la distribution du manguier s'étire de la Chine jusqu'en Iran. Autour du 10<sup>ème</sup> siècle, il a été introduit en Afrique de l'Est depuis le Moyen-Orient. Aux 16<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> siècles, les Portugais et les Espagnols ont fortement contribué à sa dispersion en Afrique et en Amérique du Sud. Depuis le Brésil, le manguier a été introduit dans les Caraïbes dans la deuxième moitié du 18<sup>ème</sup> siècle (La Barbade, République Dominicaine et Jamaïque). Au Mexique, il a été importé depuis les Caraïbes mais aussi depuis les Philippines (Morton 1987). A partir de marqueurs microsatellites, Duval et al. (2006) ont montré l'existence de deux routes d'introduction du manguier dans les Antilles françaises, la première avec des cultivars introduits d'Amérique centrale (Mexique) et du Sud (Colombie) originaires du Sud-Est Asiatique et la deuxième avec des cultivars introduits depuis les anciennes colonies françaises de l'Océan Indien. Depuis le 20<sup>ème</sup> siècle, la Floride peut être considérée comme une seconde zone de diversification de l'espèce où de nombreux nouveaux cultivars, dits floridiens, ont été sélectionnés puis introduits dans des pays producteurs tels que le Brésil, Israël ou l'Australie (Litz 2009).

### II.2.2. Production mondiale

Le manguier est cultivé dans la quasi-totalité des pays compris entre les 30<sup>èmes</sup> parallèles nord et sud, auxquels s'ajoutent quelques régions au climat favorable comme l'Espagne, Israël, la Floride ou l'Afrique du Sud (Litz 2009).

Selon la FAO (2011), la production de fruits tropicaux était estimée à plus de 82,2 millions de tonnes en 2009. La mangue était l'espèce principale avec 39% de la production mondiale de fruits tropicaux, soit un volume de 31,7 millions de tonnes. C'est la 5<sup>ème</sup> culture fruitière après la banane, l'orange, la pomme et la poire. En 2009, l'Asie était le principal producteur de mangues et comptait pour 74% dans la production mondiale de ce fruit. L'Amérique latine et les Caraïbes représentaient 14%, l'Afrique 11% et le reste était produit en Océanie, Amérique du nord et Europe. L'Inde produit, à elle seule, un tiers de la production mondiale. Près de 90% de la production mondiale de fruits tropicaux est consommée dans les pays producteurs eux-mêmes. En valeur (US\$) en 2010, la mangue est la 20<sup>ème</sup> production mondiale, toutes filières agricoles confondues et la 12<sup>ème</sup> de la filière alimentation d'origine végétale (FAO 2011).

### II.2.3. Cycle phénologique

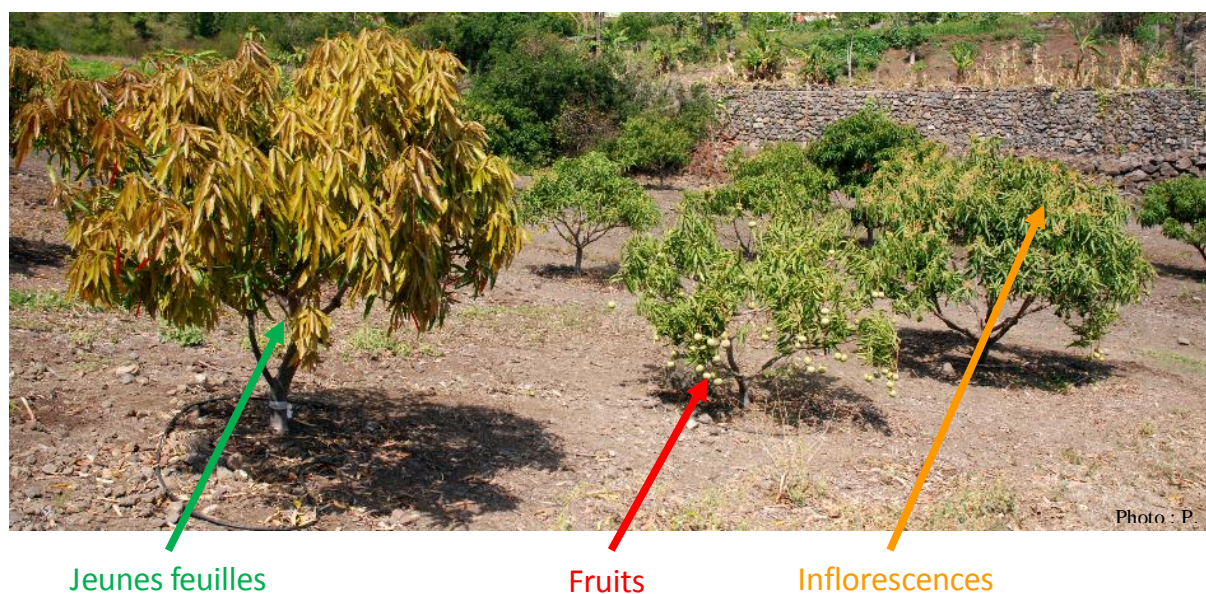
La culture du manguier est bien adaptée à un climat tropical chaud à mousson, avec une saison sèche prononcée (Litz 2009). La croissance du manguier est rythmique alternant des phases de croissance (*flush*) au niveau des bourgeons apicaux et latéraux avec des périodes de repos (Davenport & Nuñez-Elisea 2009).

Les phases de croissance végétative se produisent généralement entre une et quatre fois par an et par branche. Le développement de l'unité de croissance depuis le débourrement



du bourgeon jusqu'à l'élongation complète demande trois à six semaines (Whiley *et al.* 1991). Ce développement est découpé en 8 stades phénologiques notés de B1 à H (Annexe IV) (Dambreville 2012). Pendant cette période, 10 à 20 nouvelles feuilles sont produites par unité de croissance. Un asynchronisme entre le développement des unités de croissance est observé pendant la période de croissance végétative, entre les arbres mais également au sein de chaque arbre (Vincenot & Normand 2009).

La floraison a lieu généralement après une longue période de repos dans les zones tropicales et durant les mois frais de l'hiver en zone subtropicale. Les températures basses dans les régions subtropicales stimulent la floraison du manguier tandis que l'âge de la dernière unité de croissance est un facteur important dans les climats chauds (Davenport 2000, 2003; Van der Meulen *et al.* 1971). Dans les régions tropicales, la floraison n'est pas fonction de la saison et peut être induite, par exemple, par des traitements au nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ) (Barba 1974; Davenport 1993; Núñez-Elisea 1985; Protacio 1999). Comme pour la croissance végétative, un asynchronisme de floraison est observé aussi bien entre les arbres qu'au sein d'un même arbre. Dans les régions subtropicales, les arbres exposés à de basses températures ( $3\text{-}10^\circ\text{C}$ ) montrent une floraison groupée qui intervient environ un mois après l'exposition aux basses températures. Un froid moins intense ( $10\text{-}18^\circ\text{C}$ ) provoque des asynchronismes de floraison (Davenport & Núñez-Elisea 2009) (Figure 3).

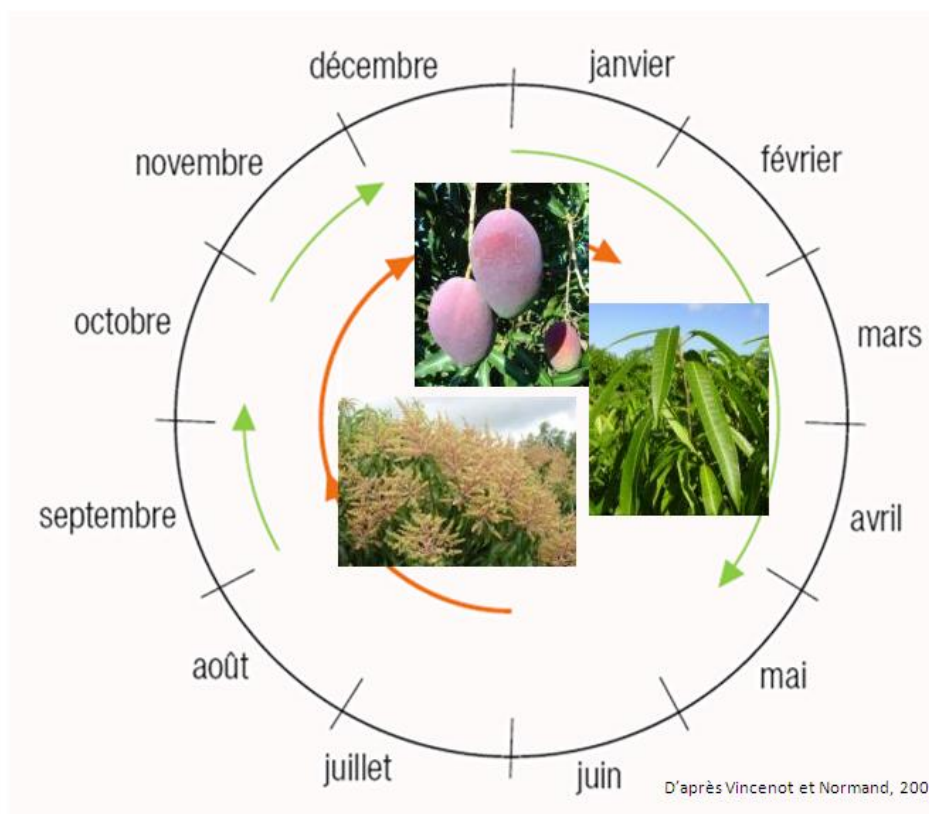


Chap. II - Figure 3 : Illustration de l'asynchronisme de croissance chez la variété José : trois arbres voisins sont dans trois états phénologiques différents (croissance végétative, fructification, floraison). Photographie réalisée en juillet dans une parcelle de la zone ouest de la Réunion (route du théâtre).

Les fleurs sont groupées en inflorescences qui apparaissent à l'extrémité des branches. Les inflorescences sont des structures ramifiées avec une forme le plus souvent pyramidale. Leur taille, leur forme et leur couleur dépendent de la variété. Le nombre de fleurs par inflorescence varie de plusieurs centaines à plusieurs milliers selon les variétés. Deux types de fleurs coexistent dans l'inflorescence : les fleurs mâles dont le pistil est avorté et qui portent une seule étamine fonctionnelle, et les fleurs parfaites, ou hermaphrodites, dont le pistil est fonctionnel. Les fleurs de manguier produisent peu de nectar et sont peu mellifères. Elles sont fécondées principalement par des mouches, des thrips et les abeilles (Litz 2009). Le développement de l'inflorescence est découpé en 8 stades phénologiques notés de B1 à G (Annexe III) (Dambreville 2012).

A la Réunion, le cycle phénologique du manguier est influencé à la fois par des facteurs climatiques (température, pluviométrie) et par des facteurs propres à la plante. Ainsi, la charge en fruits de l'arbre l'année précédente, la position ou l'âge des unités de croissance peuvent modifier le déroulement du cycle phénologique du manguier et affecter la floraison. Par conséquent, le cycle phénologique n'est pas seulement lié aux conditions climatiques mais peut être manipulé dans une certaine mesure par des pratiques culturales adaptées. L'enchaînement des différents stades phénologiques (croissance végétative, repos végétatif, floraison et récolte) peut être représenté pour un lieu et une variété, en les superposant au calendrier de l'année. Ainsi pour le cultivar Cogshall à Saint-Pierre (Figure 4), la floraison a lieu durant l'hiver austral, de juillet à septembre, et la récolte s'étale de début décembre à fin janvier. La croissance végétative commence dès la fin de la floraison, et elle s'intensifie après la récolte, au cours de la saison chaude et humide. Elle se termine en avril-mai. Elle est suivie d'une période de repos végétatif au début de l'hiver austral, repos qui précède la floraison (Vincenot & Normand 2009).





Chap. II - Figure 4 : Cycle phénologique du manguier pour le cultivar Cogshall à Saint-Pierre. Les flèches de couleur orange indiquent successivement la floraison, la croissance du fruit et la récolte. Les flèches de couleur verte indiquent des périodes de croissance végétative.

Des asynchronismes de croissance et de floraison sont également observés à la Réunion à la fois entre les arbres et au sein des arbres. Ainsi, des pousses végétatives sont présentes quasiment tout au long de l'année dans un verger. Ces asynchronismes sont faibles sur les jeunes manguiers mais augmentent avec l'âge des arbres. Ainsi, l'étalement de la floraison au sein du verger diffère en fonction de son âge : de 10-11 semaines pour des jeunes arbres (4 ans) à 16-18 semaines pour des arbres âgés (8 ans) de la variété Cogshall. Cet asynchronisme de floraison est en grande partie lié à l'asynchronisme de croissance végétative (Dambreville 2013). Ces asynchronismes représentent un problème majeur pour la protection intégrée des cultures contre les bioagresseurs s'attaquant aux inflorescences et aux fruits. En effet, une floraison étalée signifie une période de sensibilité plus longue que pour une floraison groupée. Cet étalement de la floraison se répercute ensuite sur les récoltes et la période de sensibilité des fruits (Vincenot & Normand 2009).

#### II.2.4. Le manguier à la Réunion

Le manguier est le seul représentant du genre *Mangifera* à la Réunion (CBNM 2012). Par contre, huit autres espèces d'arbres ou arbustes de la famille des Anacardiaceae y sont

présents : une espèce indigène (*Poupartia borbonica* J.F. Gmel.) et sept exotiques (*Anacardium occidentale* L., *Poupartia caffra* (Sond.), *Schinus terebinthifolius* Raddi, *Spondias cytherea* Sonnerat, *Spondias mombin* L., *Rhus longipes* Engl., *Sorindeia madagascariensis* Thouars ex DC.) dont certaines avec un intérêt agricole (baie rose (*S. terebinthifolius*), prune de cythère (*S. cytherea*), anarcadier (*A. occidentale*)). Ces espèces spontanées sont peu présentes sur l'île, excepté le faux poivrier ou « baies roses » et le faux-poivrier blanc (*R. longipes*) qui sont considérés comme des espèces invasives.

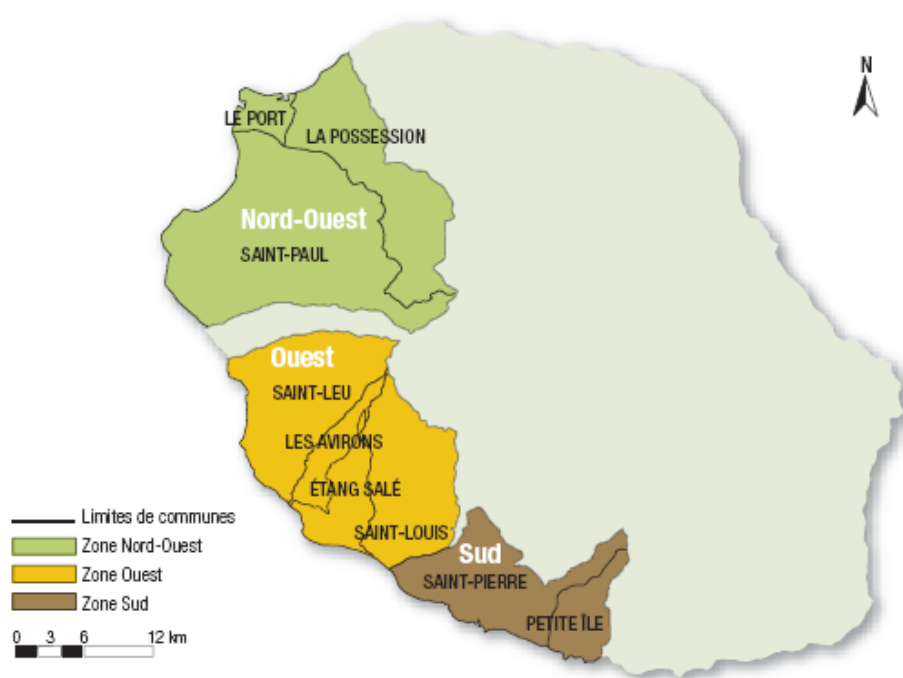
D'après Vincenot & Normand (2009), les premiers manguiers ont été introduits à la Réunion dans les années 1770 en provenance de Goa en Inde. A partir des années 1970, une forte intensification des pratiques est observée. De plus, la superficie en verger passe de moins de 50 ha dans les années 1970 à près de 300 ha dans les années 2000. Deux objectifs ont été visés : satisfaire les besoins du marché local et développer le marché de l'exportation haut de gamme. La gamme variétale s'est donc élargie en introduisant diverses variétés d'origine floridienne (Cogshall, par exemple) qui vinrent s'ajouter aux variétés d'origine indienne (José) naturellement hybridées et sélectionnées par des passionnés et des agriculteurs à la Réunion. Toutefois, les cultivars José et Cogshall (Figure 5) occupent actuellement plus de 80% des vergers. Le premier est un cultivar local très apprécié par la population réunionnaise. Il occupe 50% des superficies plantées. Le cultivar Cogshall occupe quant à lui plus de 30% de la superficie plantée. Cette mangue d'origine américaine correspond aux standards des marchés internationaux et elle constitue la majorité des exportations qui restent cependant faibles (100 t/an).



Chap. II - Figure 5 : Fruits des deux principaux cultivars de mangues de la Réunion : José à gauche et Cogshall à droite

La production de mangues à la Réunion est, pour des raisons essentiellement climatiques et sanitaires, cantonnée à la façade Ouest de l'île (côte « sous le vent »), depuis la

commune de La Possession au nord, jusqu'à la commune de Petite-Île au sud. Cette filière de production totalise environ 329 ha repartis sur près de 80 exploitations. On distingue trois zones : le Nord-Ouest, l'Ouest et le Sud. La zone Nord-Ouest est historiquement la première zone de production. Les communes de La Possession et Saint-Paul totalisent aujourd'hui près de 50% du nombre des exploitations productrices et près de 70% des surfaces de vergers de manguiers. Les exploitations productrices de mangues dans cette zone ont une taille moyenne de verger (6,1 ha) supérieure à celles des deux autres zones, respectivement, 2,1 et 3,1 ha pour les zones Ouest et Sud (Figure 6) (Vincenot & Normand 2009).



Zone	% nombre d'exploitation productrice de mangues	% de surfaces de vergers en mangue	Surface moyennes par exploitation
Nord-Ouest	48	67	6,1
Ouest	25	13	2,1
Sud	27	20	3,1

Chap. II - Figure 6 : Carte des trois zones de productions de mangues à la Réunion (en haut) et spécificité de chaque zone en termes de surfaces de vergers de manguiers et de nombre d'exploitations agricoles productrices de mangues (en bas). *Source* : Vincenot & Normand, 2009

La production de mangues peut dépasser 3 000 tonnes par an les années de bonne récolte. Cette production modeste est groupée de décembre à février. Les productions d'octobre et novembre sont particulièrement intéressantes en raison des prix de vente plus

attractifs et de conditions climatiques favorables limitant le développement des maladies fongiques et bactériennes. Les récoltes tardives sont souvent consécutives à une deuxième, voire troisième floraison. Elles sont d'autant plus tardives que le verger est en altitude. Certaines variétés présentent des floraisons étalées, mais pas forcément tous les ans (Vincenot & Normand 2009).

### II.2.5. Les ravageurs du manguier à la Réunion

Sur la trentaine d'arthropodes ravageurs mentionnés sur manguier à la Réunion, six sont plus fréquents et engendrent des dégâts pouvant avoir un impact économique (Amouroux *et al.* 2009). Lors de la croissance végétative, plusieurs espèces de cochenilles (farineuses, lécanines et diaspines) et une cécidomyie des feuilles (*Procontarinia matteiana*) sont présentes sur les feuilles. Leurs populations sont généralement bien contrôlées par les auxiliaires (parasitoïdes et prédateurs) limitant ainsi leur impact économique. Lors de la floraison, le thrips *Scirtothrips aurantii* Faure (Thysanoptera : Thripidae), la punaise *Taylorligus palus* (Taylor) (Hemiptera : Miridae) et la cécidomyie des fleurs du manguier *Procontarinia mangiferae* sont les principaux ravageurs, entraînant des pertes économiques majeures. Lors de la fructification, trois espèces de mouches des fruits (*Ceratitis capitata* (Wiedemann), *C. rosa* Karsch et *Bactrocera zonata* (Saunders) (Diptera : Tephritidae)) s'attaquent aux fruits et les rendent impropres à la commercialisation. Actuellement, à la Réunion, une seule matière active, la lambda-cyhalothrine, est homologuée pour lutter contre le thrips et la punaise à la floraison du manguier. L'utilisation de seuils de dégât économique et de suivis de populations par battage d'inflorescences permet de raisonner ces traitements.

## II.3. Cécidomyies du manguier

### II.3.1. Généralités

L'inventaire de Gagné (2010) fait état de 19 espèces de cécidomyies inféodées au manguier, *Mangifera indica*. Ces espèces sont réparties dans quatre genres (Tableau 1). Une seule espèce est présente dans les genres *Dasineura* et *Lasioptera*, deux dans le genre *Gephyraulus* et les 15 autres dans le genre *Procontarinia* (Gagné 2010). Tous les organes du manguier sont attaqués par les différentes espèces (des feuilles aux fruits en passant par les inflorescences), avec des cycles qui s'accomplissent entièrement dans la galle ou dont la pupaison se déroule au sol (Tableau 1).

Il faut ajouter à cette liste une dizaine d'autres espèces inféodées au manguier mais qui ne sont pas encore décrites (Kolesik *et al.* 2009; Raman 2012). Le genre *Procontarinia* est le seul composé exclusivement d'espèces monophages du manguier. La détermination et la classification des espèces de ce genre restent encore complexes et imparfaites. La plupart des espèces non encore décrites sont supposées appartenir à ce genre (Raman *et al.* 2009). Les

études récentes ont principalement été conduites sur les deux espèces à distribution mondiale, *P. matteiana* et *P. mangiferae*.

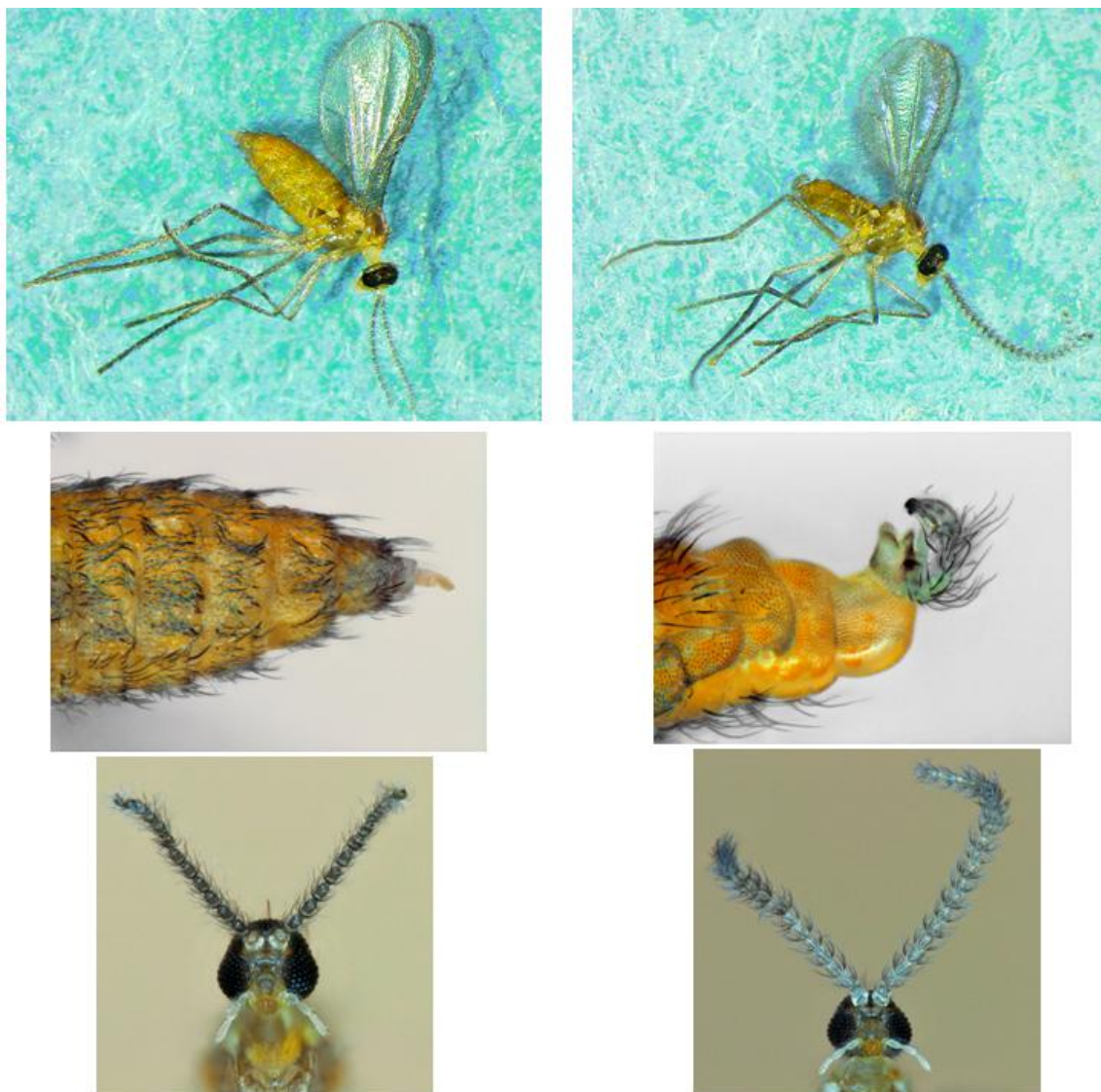
Chap. II - Table 1 : Détails des organes attaqués et de la pupaison au sol pour les 19 espèces de cécidomyies inféodées au manguier (Gagné, 2010)

Genre	Espèce	Organes attaqués	Pupaison au sol*
<i>Procontarinia</i>	<i>P. allahabadensis</i>	Feuille	-
	<i>P. amraeomyia</i>	Feuille	-
	<i>P. biharana</i>	Feuille	-
	<i>P. brunneigallicola</i>	Feuille	-
	<i>P. echinogalliperda</i>	Feuille	-
	<i>P. frugivora</i>	Fruit	Oui
	<i>P. keshopurensis</i>	Feuille	-
	<i>P. mangicola</i>	Feuille	Oui
	<b><i>P. mangiferae</i></b>	<b>Feuille, Inflorescence, Tige</b>	<b>Oui</b>
	<i>P. mangifoliae</i>	Feuille	Non
	<i>P. matteiana</i>	Feuille	Non
	<i>P. pustulata</i>	Feuille	Oui
	<i>P. robusta</i>	Feuille	-
	<i>P. tenuispatha</i>	Feuille	-
	<i>P. virdigallicola</i>	Feuille	-
<i>Gephyraulus</i>	<i>G. indica</i>	Inflorescence	Oui
	<i>G. mangiferae</i>	Inflorescence	Non (parfois oui !)
<i>Dasineura</i>	<i>D. amaramanjarae</i>	Inflorescence	Oui
<i>Lasioptera</i>	<i>L. mangiflorae</i>	Inflorescence	-

\* Pour certaines espèces, l'information concernant la pupaison n'a pas été trouvée

Le genre *Procontarinia* fait partie de la famille des Cecidomyiidae, sous-famille des Cecidomyiinae, tribu des Asphondyliini. Un caractère spécifique des espèces de ce genre est la présence d'une 'dent' sur la griffe. Pour une détermination des espèces au sein du genre *Procontarinia*, un montage particulier d'individus mâles et femelles est nécessaire (Pierre 2011). Les critères d'identification portent, entre autres, sur les antennes des femelles (la forme des articles, la présence de circumfilia et de soies) et pour *P. mangiferae* sur la présence de 2 petites soies proches de l'ovipositeur (vue en face ventrale). (Figure 8)





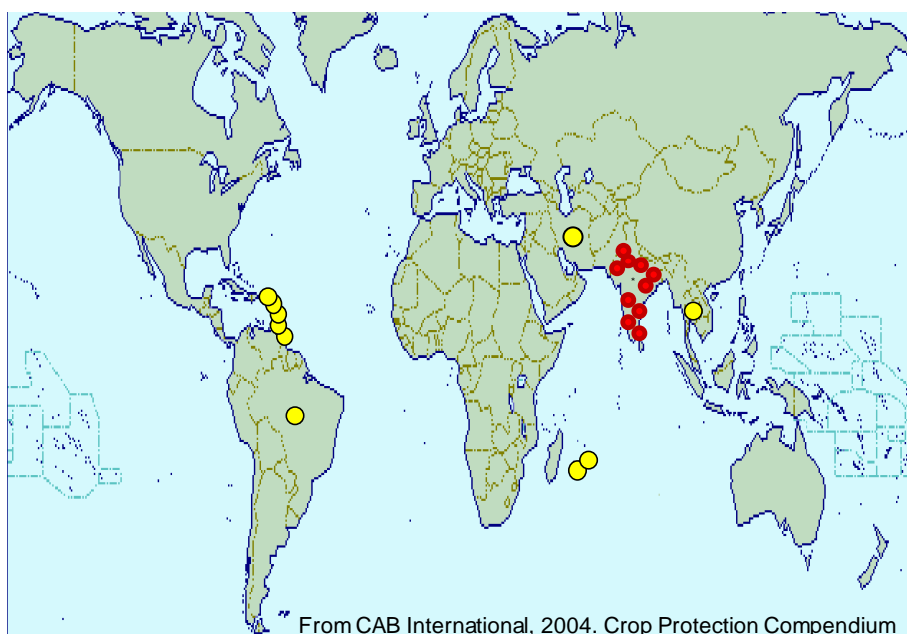
Chap. II - Figure 7 : Illustrations générales et de détails de la femelle (à gauche) et du mâle (à droite) de *P. mangiferae*. En haut, habitus ; au milieu, détail de l'abdomen ; en bas, détail de la tête vue de face. Crédits : A. Franck – CIRAD

### *II.3.2. Procontarinia mangiferae*

#### *II.3.2.1. Taxonomie et distribution*

Cette cécidomyie a été décrite la première fois à Saint-Vincent dans les Caraïbes par Felt (1911) sous le nom : *Erosomyia mangiferae*. Ensuite, Tavares (1918) l'a décrite de nouveau au Brésil sous le nom : *Mangodiplosis mangiferae*. Elle est enfin décrite deux fois en Inde, par Mani (1938) sous le nom : *Rhabdophaga mangiferae* et par Grover & Prasad (1966) sous le nom *Erosomyia indica*. En 2004, Gagné & Medina combinent l'ensemble de ces espèces sous le nom actuellement accepté *Procontarinia mangiferae*.

La cécidomyie des fleurs du manguier, *P. mangiferae*, est considérée comme indigène d'Inde et elle est invasive en Thaïlande, à l'île Maurice, à la Réunion, en Iran, dans plusieurs îles des Caraïbes (Sainte-Lucie, Saint-Vincent-et-les-Grenadines, Trinidad et Tobago, Saint-Christophe-et-Niévès, Dominique et Guadeloupe) et au Brésil (CAB 2004; Pezhman & Askari 2004). Elle doit probablement être présente dans les pays du Sud-Est asiatique d'où est originaire le manguier. (Figure 7)



Chap. II - Figure 8: Distribution mondiale de *P. mangiferae* en 2004. Source : CAB 2004; Pezhman and Askari 2004

A la Réunion, un inventaire réalisé par Plenet (1965) fait mention uniquement de la cécidomyie des feuilles du manguier, *P. matteiana*. La première mention de *P. mangiferae* date de 1974 par Etienne et Roura. Elle aurait été introduite dans le Nord – Nord-Ouest de l'île (Hugon 1979). En 1977, elle est présente sur toute l'île et elle provoque déjà des dégâts majeurs dans les vergers (Etienne 1977; Hugon 1979).

### ***II.3.2.2. Cycle de la cécidomyie des fleurs du manguier***

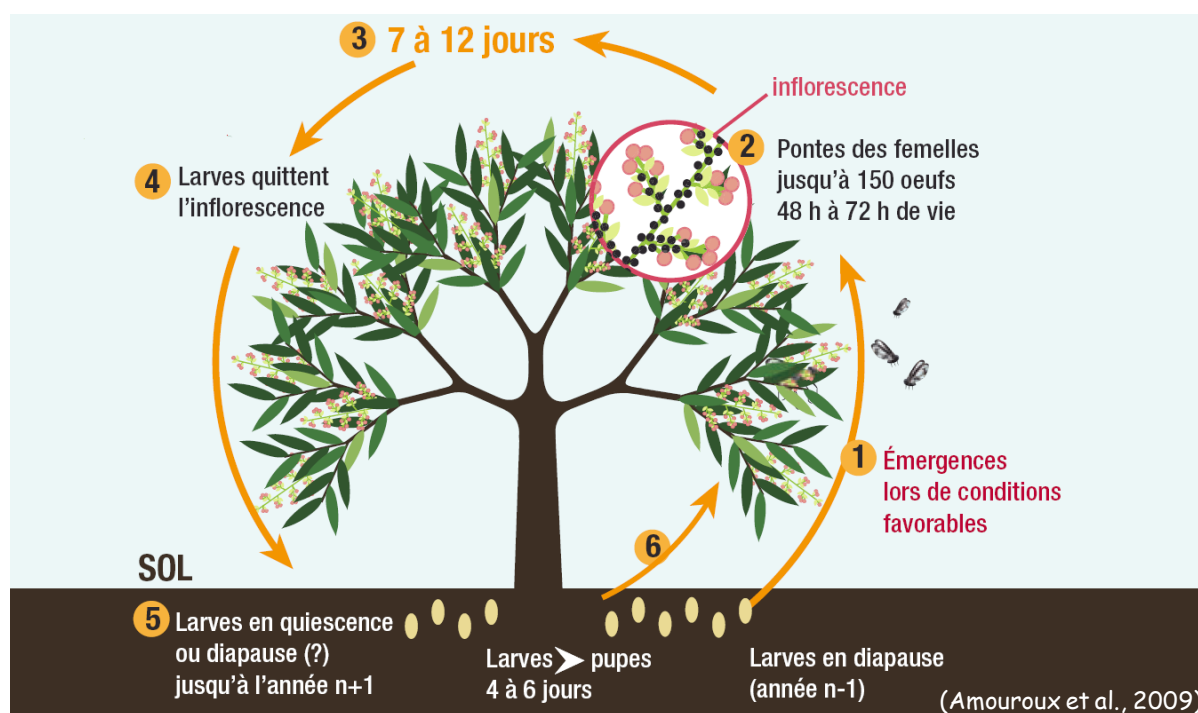
La description du cycle de vie en Inde est détaillée par Prasad (1971). Les informations ci-dessous sont issues de cet ouvrage sauf mention contraire. (Figure 9)

En Inde, les émergences débutent en fin de matinée et durent jusqu'à quatre heures de l'après-midi. Après l'accouplement et un temps de latence, les femelles commencent à pondre dès cinq heures de l'après-midi jusqu'à minuit.

Le lieu de ponte des femelles dépend de la disponibilité en organes favorables. A l'aide de leur ovipositeur, elles choisissent le site où déposer un à six œufs puis changent de

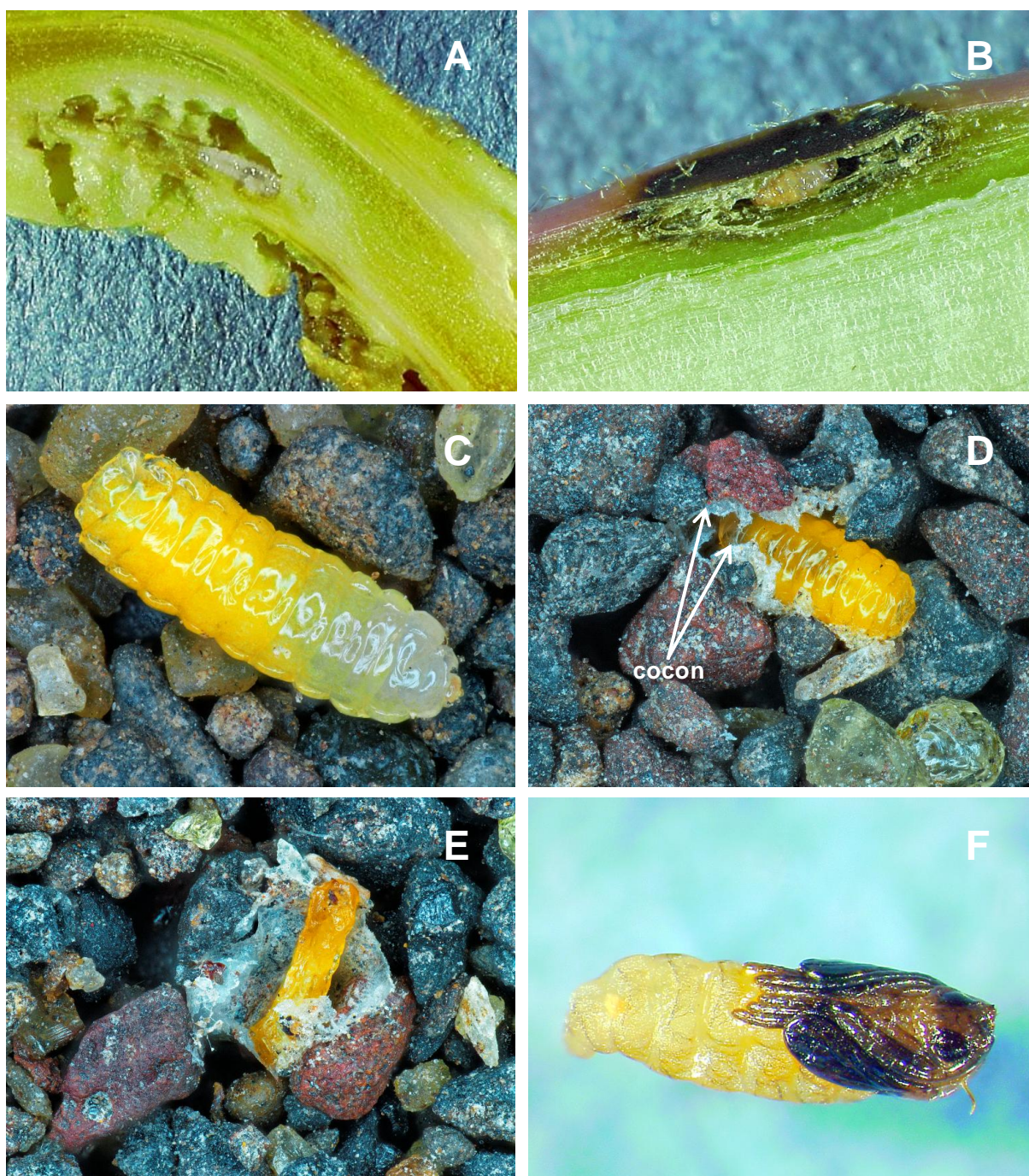
place en restant sur le même organe ou en se déplaçant plus loin. Le nombre d'œufs dans l'abdomen d'une femelle mature varie de 80 à 250. Le temps moyen d'incubation de l'œuf est de 35h. Pezhman et Askari (2004) décrivent la durée des différents stades en conditions naturelles dans la région de Minab en Iran. La durée du cycle complet varie dans cette région entre 14 et 25 jours.

Les larves, d'une durée de développement comprise entre 6 et 13 jours, provoquent les dégâts aux organes du manguiier. Le premier stade larvaire est une phase mobile durant laquelle la larve migre depuis le lieu de ponte jusqu'à son lieu d'alimentation à l'intérieur de tissus tendres du manguiier. Cette phase est accomplie en moins de 48h. Une fois ce site atteint la larve mue. Durant les deux stades larvaires suivants, la larve s'alimente à l'intérieur des tissus du manguiier (Figure 10A). La larve blanche commence à se colorer en orange au deuxième stade. A la fin du troisième stade larvaire, la larve cesse de s'alimenter et perce un trou à travers la paroi de la galle pour s'éjecter au sol. Une fois au sol, les larves s'enfouissent et se protègent à l'intérieur d'un cocon de soie (Figure 10). Deux événements sont alors possibles. Soit la larve s'empuie, soit elle rentre en diapause. Certaines larves sortent de diapause dès le retour de conditions favorables tandis que d'autres restent en diapause plusieurs années. Les cocons sont des petites structures ovoïdes mesurant 1,2 x 1mm. Ils sont formés par un réseau de fibres sécrétées par la larve qui se trouve en forme de U à l'intérieur du cocon.



Chap. II - Figure 9 : Cycle biologique de la cécidomyie des fleurs. *Source* : Amouroux et al., 2009





Chap. II - Figure 10 : Illustration des stades larvaires et de la puppe de *P. mangiferae*. A : larve incolore du deuxième stade dans le rachis principal d'une inflorescence. B : larve colorée du troisième stade dans sa galle. C : larve colorée du troisième stade au sol. D : larve dans son cocon. E : Larve desséchée dans son cocon. F : puppe. Crédits : A. Franck - CIRAD

### II.3.2.3. Dynamique des populations

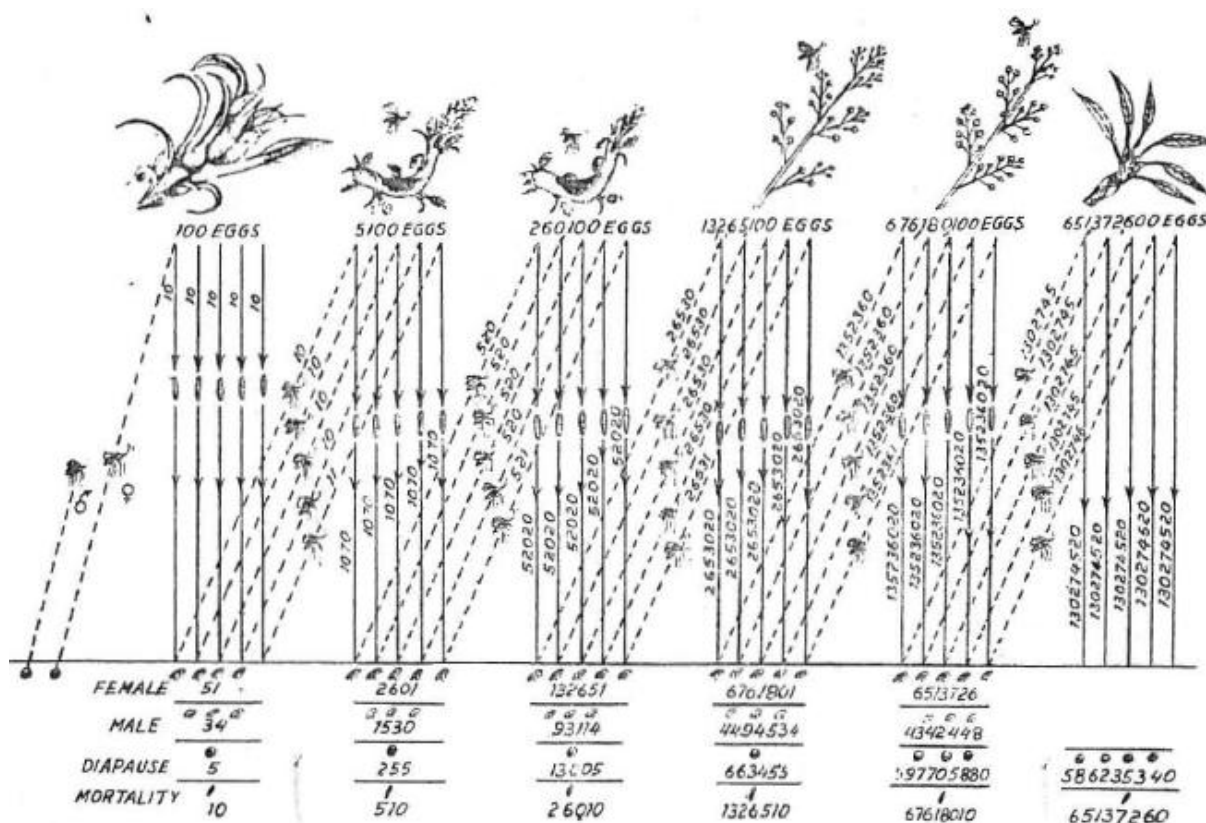
La dynamique des populations de cette espèce a été étudiée en Inde dans les années 1970. Différentes techniques d'échantillonnage ont été mises en place : pièges à émergence, prélèvements de sol, dissection des organes du manguier (bourgeons, inflorescences, fruits), interception des larves s'éjectant des organes. Des suivis ont été réalisés pendant la saison de floraison du manguier en Inde, du mois de novembre au mois de mars, sur plusieurs années avec des relevés quotidiens ou ponctuels (Grover 1985; Prasad 1971; Prasad & Grover 1974).

Plusieurs points sont à retenir de ces études :

- les cécidomyies apparaissent en Inde à la fin du mois de novembre ou au début du mois de décembre, ce qui correspond à l'apparition des premières inflorescences de manguier. Les adultes émergent de larves entrées en diapause l'année précédente ou lors d'années antérieures (jusqu'à 10 ans en arrière). Aucune information n'est fournie concernant les facteurs levant la diapause des larves.
- les effectifs de larves dans le sol jouent un rôle majeur dans la dynamique des populations. Un sex-ratio légèrement déséquilibré en faveur des femelles (54:46) est observé.
- cinq à six générations se succèdent jusqu'à la fin de la floraison au mois de mars. Les larves de la dernière génération s'enfouissent dans le sol et entrent en diapause pour plusieurs mois. Aucune information n'est fournie concernant les facteurs induisant la diapause des larves.
- tous les stades de développement des inflorescences sont attaqués par cette cécidomyie depuis le bourgeon florifère jusqu'à la formation des fruits. En l'absence d'inflorescence, les femelles peuvent également pondre sur les jeunes pousses végétatives et les très jeunes feuilles. Cette faculté à se nourrir sur plusieurs organes fait d'ailleurs supposer à Raman (2009) l'existence de plusieurs sous-populations génétiquement différenciées de *P. mangiferae*.
- les pourcentages d'organes infestés peuvent être très élevés (50%-90%) avec des variations au cours du temps et des années. Les populations de larves dans le sol et les émergences des adultes varient également pendant la floraison. Les populations de larves et les dégâts engendrés sur les parcelles varient en fonction des parcelles et des années. Les pertes de production engendrées s'élèvent en moyenne à 75%.

Prasad (1971) établit une simulation numérique de l'évolution des populations à partir d'un couple de cécidomyie. Les paramètres utilisés sont un ratio femelle:mâle de 51:49, une ponte de 100 œufs viables par femelle, une mortalité de 10% et un taux de diapause de 5%. Pendant 5 générations, la reproduction se déroule sur les inflorescences. A partir d'un couple, il obtient plus de 676 millions d'œufs pondus à la 5<sup>ème</sup> génération (Figure 11).



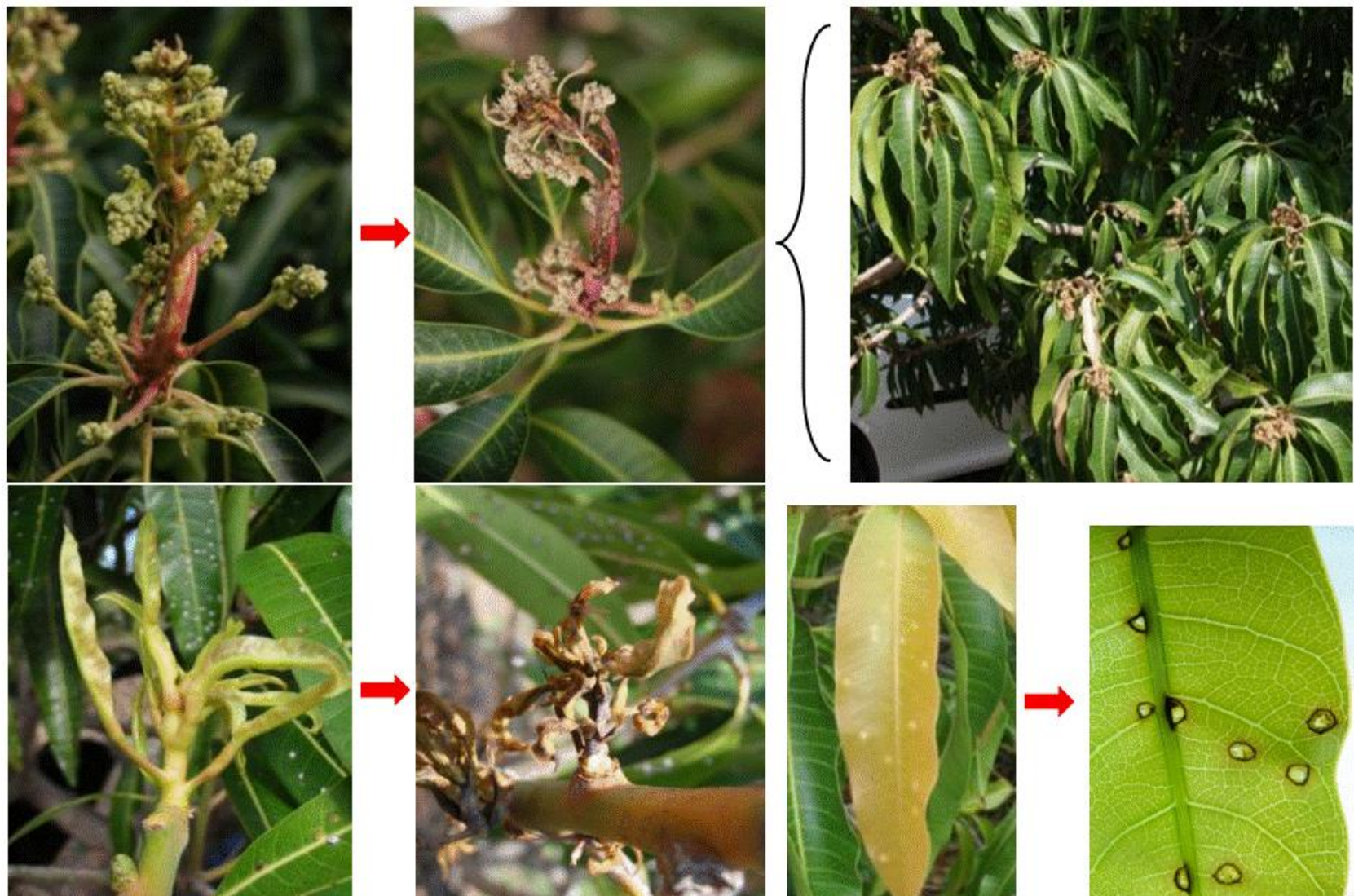


Chap. II - Figure 11: Diagramme de la croissance de la population de *P. mangiferae* à partir d'un couple en début de floraison. Etablie sur une base de 100 œufs par femelle (100% viables), une mortalité de 10%, une diapause de 5% pour les 5 premières générations et une émergence de 51% de femelles et de 34% de mâles. Source : Prasad, 1971

La dynamique des populations a également été décrite en Iran par Pezhman (2004). Les populations augmentent durant la saison de floraison de manière régulière jusqu'à une densité maximale de 57,5 larves par inflorescence. Le pourcentage d'inflorescences infestées et le nombre moyen de larves par inflorescence varient entre années et entre régions. Pour un verger et une année données, les valeurs maximales obtenues sont de 77% d'infestation et en moyenne 22,4 larves par inflorescence.

#### II.3.2.4. Dégâts et lutte contre *P. mangiferae*

Les larves de *P. mangiferae* se développent dans de tendres tissus en croissance du manguiier : (i) les tissus végétatifs, comme les bourgeons végétatifs et les jeunes feuilles ; (ii) les tissus florifères comme les inflorescences à tous leurs stades de développement ; (iii) les jeunes fruits tout juste formés. Les galls et leurs conséquences varient en fonction des organes attaqués (Figure 12).



Chap. II - Figure 12 : Galles et dégâts de *P. mangiferae* sur les inflorescences (en haut), les unités de croissance végétative (en bas à gauche) et les jeunes feuilles (en bas à droite). Une flèche indique une période d'une semaine. Crédits : P. Amouroux

En Inde, Prasad (1971) considère que peu d'espèces de cécidomyies causent autant de dégâts sur manguier que cette cécidomyie. La lutte chimique préconisée en Inde dans les années 1970 contre la cécidomyie des fleurs du manguier utilisait des traitements réguliers à base de DDT ou de diazinon pour leur effet « knock-down » sur les adultes, de dimecron pour son action systémique dans la plante et d'endrine pour le traitement des larves dans le sol (Prasad 1971). Au début des années 1980, parmi huit insecticides testés, le fenitrothion et le dimethoate se sont révélés les deux plus efficaces avec trois applications, une tous les 15 jours dès le début de la floraison (Srivastava & Tandon 1983).

A la Réunion, la cécidomyie des fleurs du manguier peut entraîner la destruction entière d'une floraison, en particulier au début de l'hiver (Amouroux & Normand 2010). L'impact économique de ces dégâts est majeur puisque les floraisons précoces correspondent à une récolte précoce qui est valorisée par un prix de vente élevé. Dans les années 1980, jusqu'à 11 traitements pouvaient être effectués pendant la floraison pour lutter contre ce ravageur (Vuillaume 1988). La nocivité des molécules utilisées, pour l'environnement et les utilisateurs, a entraîné leur suppression du marché. Aujourd'hui, aucune substance n'est homologuée contre la cécidomyie des fleurs du manguier à la Réunion.

Le contrôle de ce ravageur avec des traitements chimiques raisonnés est peu efficace (Barbosa *et al.* 2002). Cette inefficacité est liée à la difficulté à déterminer une date d'application optimale, à la succession des générations au cours de la floraison et au fait que les larves sont protégées à l'intérieur des tissus du manguier. En l'absence d'effet de bordure sur les niveaux de populations, Barbosa *et al.* (2006) recommandent l'application des traitements à l'ensemble du verger. La collecte et la destruction des organes attaqués sont également proposées (Barbosa 2005).

La recherche de stratégies alternatives nécessite, entre autres, une meilleure connaissance du cycle de cet insecte. Le développement d'une agriculture respectueuse de l'environnement correspond d'ailleurs aux attentes actuelles de la société (plan ile verte, plan ECOPHYTO 2018).



## Références bibliographiques

- Agreste (2012) Memento 2011 agricole et rural. La Réunion (Résultats 2010). *Agreste La Réunion* **75**.
- Amouroux P, Normand F (2010) Survey of mango pests on Réunion Island, with a focus on pests affecting flowering. In: *9th International Mango Symposium*, p. 24, Sanya, China.
- Amouroux P, Normand F, Vincenot D (2009) Le raisonnement de la conduite du verger. In: *Guide de Production Intégrée de mangues à la Réunion*.
- Barba R (1974) Induction of flowering of the mango by chemical spray. *Proceedings of the Crop Science Society of the Philippines* **5**, 154-160.
- Barbosa FR (2005) Manejo integrado de pragas da mangueira. *Annals of the I Simposio de Mango do vale do Sao Francisco*, 1 - 38.
- Barbosa FR, Bezerra da Silva CS, de Lima CPF, de Cassia Rodrigues Gonçalves Gervasio R (2006) Estudo comparativo entre o nível populacional de *Erosomyia mangiferae* (Diptera: Cecidomyiidae) na bordura e interior da parcela de mangueira em producao integrada. In: *XXI Congresso Brasileiro de Entomologia*, Pernambuco, Brasil.
- Barbosa FR, Gonçalves ME, De Souza EA, *et al.* (2002) Chemical control of *Erosomyia mangiferae* on mango trees at the sao francisco river valley, Brazil. *Annals of the VII International Mango Symposium*, 261-261.
- Bompard JM (1993) The genus *Mangifera* re-discovered: the potential contribution of wild species to mango cultivation. *Acta Hort. (ISHS)* **341**, 69-77.
- CAB I (2004) Crop Protection Compendium. In: *2004*. CAB International, Wallingford, UK.
- CBNM (2012) Flore - Conservatoire Botanique National de Mascarin. <http://www.cbnm.org/>
- Dambreville A (2012) Croissance et développement du manguier (*Mangifera indica* L.) in natura – Approche expérimentale et modélisation de l'influence d'un facteur exogène, la température, et de facteurs endogènes architecturaux, Montpellier II. *Manuscrit de thèse*, 185pp.
- Dambreville A, Normand F, Lauri P-É (2013) Plant growth co-ordination in natura: a unique temperature-controlled law among vegetative and reproductive organs in mango. *Functional Plant Biology* **40**, 280-291.
- Davenport TL (1993) Floral Manipulation in Mangos. In: *Conference on Mango in Hawaii* (ed. Chia CL ED, editors), pp. 545-560, Honolulu, Hawaii. Honolulu (HI): University of Hawaii.
- Davenport TL (2000) Processes Influencing Floral Initiation and Bloom: The Role of Phytohormones in a Conceptual Flowering Model. *HortTechnology* **10**, 733-739.
- Davenport TL (2003) Management of Flowering in Three Tropical and Subtropical Fruit Tree Species. *HortScience* **38**, 1331-1335.
- Davenport TL, Nuñez-Elisea R (2009) Reproductive Physiology. In: *The Mango - Botany, production and uses* (ed. Litz RE), pp. 97-169. CAB International, Wallingford, UK.
- de Candolle A (1884) *Origin of cultivated plants*, London. 468pp.
- Duval M-F, Risterucci A-M, Calabre C, *et al.* (2006) Genetic diversity of caribbean mangoes (*Mangifera indica* L.) using microsatellite markers **820**, 183-188.
- Etienne J (1977) Notes sur les cécidomyies du manguier à la Réunion (ed. I.R.A.T.). I.R.A.T., Ile de la Réunion, France.

- Etienne J, Roura A (1974) Note sur l'entomofaune des manguiers à la Réunion. In: *Rapport I.R.A.T.* (ed. I.R.A.T.), pp. 89-92, Ile de la Réunion, France.
- FAO (2011) Groupe Intergouvernemental sur la banane et les fruits tropicaux - Situation actuelle et perspectives à court terme. In: *Comité des produits*, p. 7. FAO, Yaoundé (Cameroun).
- Felt EP (1911) A generic synopsis of the Itonidae. *Journal of the New York Entomological Society*, 31-62.
- Gagné RJ (2010) Update for a catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Digital version 1.
- Gagné RJ, Medina CD (2004) A new species of *Procontarinia* (Diptera : Cecidomyiidae), an important new pest of mango in the Philippines. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **106**, 19-25.
- Grover P (1985) Population Fluctuation of *Erosomyia indica* & *Dasineura amramanjarae* and co-related extend of damage. *Cecidologia indica* **VII**, 43-57.
- Grover P, Prasad SN (1966) Studies on Indian gall midges XVI: Four species of gall midges (Cecidomyiidae: Diptera) affecting inflorescence of mango. *Cecidologia indica* **1**, 1-19.
- Hugon R (1979) (1979) The complex of gall-forming organisms and cecidomyids of mango in the Island of Réunion, 413-422.
- Kolesik P, Rice AD, Bellis GA, Wirthensohn MG (2009) *Procontarinia pustulata*, a new gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae) feeding on mango, *Mangifera indica* (Anarcadiaceae), in northern Australia and Papua New Guinea. *Australian Journal of Entomology* **48**, 310-316.
- Litz E (2009) *The Mango: Botany, Production and Uses*, 2nd edn. 669pp.
- Mani MS (1938) Studies on Indian Itonididae (Cecidomyiidae: Diptera). V. Descriptions and records of midges in the Pusa Collection. *Records of the Indian Museum* **40**, 331-336.
- Morton JF (1987) Mango. In: *Fruits of warm climates*, pp. 221-239. Julia F. Morton, Miami, FL.
- Mukerjee SK (1953) Origin, distribution and phylogenetic affinity of the species of *Mangifera* L.1. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* **55**, 65-83.
- Núñez-Elisea R (1985) Flowering and fruit set of a monoembryonic and polyembryonic mango as influenced by potassium nitrate sprays and shoot decapitation. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **98**, 179-183.
- Oehler J-F, Lénat J-F, Labazuy P (2008) Growth and collapse of the Reunion Island volcanoes. *Bulletin of Volcanology* **70**, 717-742.
- Pezhman H, Askari M (2004) A study on the biology of mango inflorescence midge in Hormozgan province. *Applied Entomology and Phytopathology* **72**, 19-29.
- Pierre E (2011) Les diptères nématocères : la préparation microscopique. [http://ephytia.inra.fr/caracterisation/caracterisation\\_utilisateur/index\\_appli.php?portail=bioagresseurs&produit=caracterisation&main=56&ssrub1=36&ssrub2=37](http://ephytia.inra.fr/caracterisation/caracterisation_utilisateur/index_appli.php?portail=bioagresseurs&produit=caracterisation&main=56&ssrub1=36&ssrub2=37) Accédé le 13/01/2012
- Plenet A (1965) Parasites animaux des principales plantes cultivées à la Réunion, Congrès de la Protection des cultures tropicales Marseille, France, 203-216.
- Prasad SN (1971) *The Mango Midge Pests* Cecidological Society of India, Allahabad, India. 172pp.

- Prasad SN, Grover P (1974) Population fluctuation of *Erosomyia indica* Grover. *Cecidologia indica* **IX**, 1-38.
- Protacio C (1999) A model for potassium nitrate-induced flowering in mango **2**, 545-552.
- Raman A (2012) Adaptive radiation and diversification in gall-inducing insects in the Indian subcontinent: search for a pattern. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* **59**, 177-187.
- Raman A, Burckhardt D, Harris KM (2009) Biology and adaptive radiation in the gall-inducing Cecidomyiidae (Insecta Diptera) and Calophyidae (Insecta Hemiptera) on *Mangifera indica* (Anacardiaceae) in the Indian subcontinent. *Tropical Zoology* **22**, 27-56.
- Raunet M (1991) *Le milieu physique et les sols de l'île de la Réunion, conséquences pour la mise en valeur agricole*. CIRAD, Saint-Denis, Ile de la Réunion, France. 438pp.
- Srivastava RP, Tandon PL (1983) Field evaluation of some insecticides for the control of mango blossom midge, *Erosomyia indica*. *Pesticides* **17**, 21.
- Tavares J (1918) Cecidologia brasileira: cecídias que se criam em plantas das famílias das Verbenaceae, Euphorbiaceae, Malvaceae, Anacardiaceae, Labiatae, Rosaceae, Anonaceae, Ampelidaceae, Bignoniaceae, Aristolochiaceae e Solanaceae. *Brotéria, Série Zoológica* **16**, 21-48.
- Van der Meulen J, Smith T, van den Boom I, *et al.* (1971) *Mango Growing in South Africa* Department of Agricultural Technical Services, Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, Nelspruit, South Africa. 40pp.
- Vincenot D, Normand F (2009) *Guide de production intégrée de mangues à la Réunion* CIRAD et Chambre d'Agriculture, Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France. 121pp.
- Vuillaume C (1988) Methode de lutte contre les cécidomyies du manguier à l'île de la Réunion - Station de Bassin-Martin.
- Watson L, Dallwitz MJ (1992) The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 18th May 2012.
- Whiley AW, Rasmussen TS, Wolstenholme BN, Saranah JB, Cull BW (1991) Interpretation of growth responses of some mango cultivars grown under controlled temperatures. *Acta Hort. (ISHS)* **291**, 22-31.



Le premier objectif de la thèse a été d'évaluer la diversité spécifique et la structuration génétique des populations de *P. mangiferae* à l'île de la Réunion. L'enjeu de cette étude était double. Il s'agissait de déterminer si les cécidomyies des fleurs présentes à la Réunion constituaient une seule espèce ou un complexe d'espèces, puis de déterminer les facteurs biotiques et/ou abiotiques pouvant expliquer la structuration des populations observée.

### III.1. Développement de marqueurs moléculaires : les microsatellites

Pour ces études de diversité génétique des populations et d'identification d'espèces, nous avons développé puis validé onze marqueurs microsatellites spécifiques à la cécidomyie des fleurs du manguiers. Les microsatellites ou SSR (Single Sequence Repeats), sont des motifs d'une à six bases répétées « n » fois dans le génome. Ils présentent comme avantages d'être codominants, neutres, hautement polymorphes et à évolution rapide, très fréquents et bien répartis dans le génome, reproductibles, et faciles à manipuler (Tagu & Moussard 2005). Les microsatellites sont des marqueurs qui ont largement contribué à la résolution d'études de structuration des populations chez de nombreux organismes. Ainsi, il existe un grand nombre de logiciel utilisant ces marqueurs.

Les marqueurs développés ont été publiés sous la référence suivante :

Molecular Ecology Resources Primer Development C, A'Hara SW, Amouroux P, *et al.* (2012) Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 August 2011–30 September 2011. *Molecular Ecology Resources* **12**, 185-189.

La publication suivante correspond au manuscrit original déposé dans la base de données de *Molecular Ecology resources*.

## ARTICLE A: Isolation and characterization of microsatellite markers from *Procontarinia mangiferae* (Felt).

P. AMOUROUX<sup>1,2,3</sup>, F. NORMAND<sup>1</sup>, S. NIBOUCHE<sup>4</sup>, H. DELATTE<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD, UPR HortSys, Station de Bassin Plat, BP180, F-97455 Saint-Pierre, La Réunion, France

<sup>2</sup> Corresponding author, e-mail: paul.amouroux@cirad.fr

<sup>3</sup> Université de la Réunion, 15 avenue René Cassin BP 7151, F-97715 Saint-Denis Messag, Cedex 9, La Réunion, France

<sup>4</sup> CIRAD, UMR PVBMT, 7 chemin de l'IRAT, Ligne Paradis, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France.

**Keywords:** Ecological genetics, Invasive species, Insects, Agriculture.

### Abstract

Eleven new polymorphic microsatellite loci were developed for the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae*, and their amplification characteristics are described. These markers were tested on two natural populations of mango blossom gall midge from Réunion Island. Allele frequencies supported Hardy–Weinberg equilibrium for all loci. These new markers will be a useful tool to study genetic diversity in natural populations of this species in different ecological and demographic contexts.

Cecidomyiidae, or gall midges, is one of the largest families of the order Diptera. Many gall midge species are pests of food crops, ornamental plants, and forest trees (Dorchin 2008). *Procontarinia mangiferae*, or mango blossom gall midge, is a pest specific to mango (*Mangifera indica*) and is widely distributed within the mango production areas in the tropics (CAB 2004; Gagné 2010). The species was first described in West Indies (Felt 1911) but it is probably native from South-East Asia, the centre of origin and diversity of the genus *Mangifera* (Bompard 2009). The mango blossom gall midge is mentioned for the first time in Réunion Island (French overseas territory, South-West Indian Ocean, 20°52'S 55°31'E) by Etienne and Roura (1974), but its precise date of introduction is unknown. Nowadays, it has been reported in all mango growing areas of Réunion Island and it is one of the major pests for mango orchards (Amouroux *et al.* 2009). Integrated Pest Management programs are

currently under development in mango orchards. But chemical treatments are ineffective against this species, and knowledge on its life cycle is reduced. In order to develop non-chemical alternative methods for the control of its populations and damages, there is a need to develop a better knowledge of mango blossom gall midge bio-ecology and genetics. In this study, we report the isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellites loci for *P. mangiferae*.

Our populations of mango gall midge larvae were obtained from mango inflorescences from two natural populations from Réunion Island at the Lycée Agricole, Saint-Paul (n=62) and from Piton Defaud, Saint-Paul (n=34). Larvae were conserved in 2 mL eppendorf tubes filled with 96° ethanol and stored at -20°C. Whole genome DNA was extracted according to a protocol modified from Delatte *et al.* (2005). Ninety-six larvae were individualized in a 96-well microplate, each well being filled with 25 µL of buffer (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 0.45% Tween 20, 0.45% Nonidet P40 and proteinase K to final concentration of 500 µg/mL). The microplate was sealed hermetically and placed one night in an oven at 65°C. The following day, the microplate was briefly centrifuged and 35 µL of HPLC water was added in each well.

Microsatellite-enriched libraries (GA)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> were constructed according to Billotte *et al.* (1999) with slight modifications as follows. DNA was restricted by HaeIII (Biolabs) and submitted to a hybridization-based capture with biotin-labeled microsatellite oligoprobes I5(CT)<sub>8</sub> and I5(CA)<sub>8</sub> and streptavidin-coated magnetic beads. It was then cloned in the pGEM-T vector (Promega) and transformed by electroporation into competent DH10B cells (Invitrogen). Among all the white colonies, 192 were screened by PCR amplification directly from bacterial colonies using Rsa 21 primer. We transferred PCR products on Hybond-N + nylon membranes (Amersham), which were hybridized at 56 °C with [Y32P] dATP 5'-end labelled (GT)<sub>15</sub>. Ninety-six positive clones were sent for sequencing (Cogenics). Among those clones, 72 sequences bearing microsatellite motives were found. Sequences were checked and aligned, and SSR motives detected with the SAT software (Dereeper *et al.* 2007). This software also automatically designed primers for the targeted sequences and flanking regions of microsatellite motives. Nevertheless the chosen primer pairs were also double-checked manually using the Primer 3 software ([http://www.broadinstitute.org/genome\\_software/other/primer3.html](http://www.broadinstitute.org/genome_software/other/primer3.html)). Finally, 16 sequences were selected for primer design among 41 sequences having adequate flanking regions for primer designing.

We evaluated the variability of these loci in two steps. First, we checked for polymorphism at each of the 16 chosen loci for ten individuals using agarose gel (3%) electrophoresis. Second, we genotyped 96 individuals from two natural populations described above, using 11 of the 16 loci showing polymorphism and good-quality PCR products (different PCR conditions were tested). We then multiplexed these primers in two mixes, the

first one with six primers and the second one with five primers (one primer of each pair was fluorescently labeled, see Table 0). The reaction was performed in a final volume of 10 µL including 15–20 ng of DNA, 0.3 µM of each primer and master mix of Qiagen multiplex PCR kit. We used the following procedure for amplification: denaturation at 94°C for 3 min, 35 cycles consisting of 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of hybridization at 54°C, and 35 s of elongation at 72°C. After amplification, PCR were checked on agarose gels (4%), DNA amplification was diluted, and for each sample we added an internal size standard (GeneScan LIZ 500, Applied Biosystems) and used an ABI prism 3110 for genotyping. Data were analysed with the Genemapper version 2.5 software (Applied Biosystems).

Considering the two populations, all loci were polymorphic (Table 0). Presence of null allele was estimated with Micro-Checker version 2.3.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). According to Micro-Checker one-line help, Brookfield 1 null estimator was used to correct our genotypic data (Table 0). Population genetic parameters were estimated with Fstat version 2.9.3.2 (Goudet 2001). All allele frequencies supported Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) (after Bonferroni correction, adjusted p-value for 5% nominal level is 0.0046; Table 0). Significant linkage disequilibrium was detected in six out of 55 possible pairs of loci for the population of Lycée Agricole and in four pairs of loci for the population of Piton Défaud (after Bonferroni correction, adjusted p-value for 5% nominal level is 0.0009). Pairs of loci showing significant disequilibrium were PmCIRB10xPmCIRF5, PmCIRB12xPmCIRB6, PmCIRB12xPmCIRE12, PmCIRB6xPmCIRE12, PmCIRC62xPmCIRF5, PmCIRE12xPmCIRF5 for the population of Lycée Agricole and PmCIRC12xPmCIRB12, PmCIRC12xPmCIRE12, PmCIRC12xPmCIRF5, PmCIRE12xPmCIRF5 for the population of Piton Défaud. In all but one case the linkage observed between pairs of loci differ in sample sets derived from different populations suggesting that the markers are not physically linked. These 11 new markers will be useful to study the genetic diversity in natural populations of *P. mangiferae* in different ecological and demographic contexts.

### *Acknowledgements*

We would like to thank Christophe Simiand for his technical help. This work was supported by the European Agricultural Fund for Rural Development (project ECOFRUT).

### *Data Accessibility*

DNA sequences: Genbank accessions number JF746879-JF746889

Chap. III - Table 0: Characterization of microsatellite loci isolated from *Procontarinia mangiferae* tested on 62 individuals of the population of Lycée Agricole (Pop: LA, Saint-Paul, Réunion Island) and on 34 individuals of the population of Piton Defaud (Pop: PD, Saint-Paul, Réunion Island). Tm: locus-specific annealing temperature, A: number of alleles, G: number of successful genotyped individuals for a given locus, He: expected heterozygosity, Ho: observed heterozygosity, Fis: fixation index according to Weir and Cockerham (1984) using Bonferroni's correction, Brookfield 1: null allele frequencies obtained using methods by Brookfield (1996). All loci were tested for HWE departure, none were significant. \* indicates presence of null allele.

Mix	Locus- Genbank accession number	Repeat motif	Primer sequences	Fluorescent label	Size of cloned fragment	Allele size range (bp)	Tm (°C)	Pop	A	G	He	Ho	Fis (W&C)	p- value	Brookfield 1
2	PmCIRB12 - JF746887	(ct)22	F: AGGGAATTTGGAGTGGAC R: GATCATCCCGCAGACTTT	ROX	231	231-239	55.4	LA PD	5 6	62 32	0.543 0.538	0.516 0.563	0.051 -0.046	0.327 0.723	0.158* -0.021
1	PmCIRB10 - JF746880	(ct)10	F: CCGCTGTTCTATGTACCG R: GAACAAAAGACGCAATCG	FAM	144	140-144	55.2	LA PD	2 3	62 32	0.137 0.092	0.129 0.094	0.057 -0.022	0.282 1.000	0.031* -0.003
2	PmCIRB6 - JF746882	(ct)10	F: CCTTCGTTACAGCTCAC R: AAAGCGGGAGATAGAGGA	ROX	155	157-159	55.0	LA PD	2 1	62 32	0.339 0.000	0.323 0.000	0.050 -	0.377 -	0.104* 0.000
1	PmCIRC12 - JF746885	(tc)20	F: TCGAATTCATCCGTTTC R: CCCATGCAGCTACTTTCA	ROX	211	201-257	55.1	LA PD	9 7	62 31	0.479 0.531	0.468 0.516	0.024 0.029	0.441 0.505	0.108* 0.004
2	PmCIRC62 - JF746888	(ac)7	F: GCCGATTATTTTCATGTGC R: ACCAAAAGATACAACATCACAA	FAM	233	229-235	54.9	LA PD	3 1	62 32	0.048 0.000	0.032 0.000	0.328 -	0.046 -	0.015* 0.000
1	PmCIRD12 - JF746884	(ag)16	F: TGGAGCGTTTGTGATTTT R: ATCAATGGTGCGAATTTT	NED	198	192-202	54.5	LA PD	3 4	60 32	0.486 0.349	0.483 0.419	0.005 -0.206	0.527 1.000	-0.001 -0.057
1	PmCIRD8 - JF746879	(gt)9	F: ACATAACGATGTTTTACGACAG R: CCTGGCATTTTATGCACT	ROX	127	129-137	54.6	LA PD	3 3	62 31	0.657 0.621	0.726 0.710	-0.106 -0.145	0.918 0.909	-0.033 -0.060
1	PmCIRE11 - JF746886	(tc)8	F: TTGCATTTTACTTGCGAAT R: ACTTGATGCATCATAAACCG	VIC	233	227-233	54.5	LA PD	3 2	60 32	0.550 0.490	0.550 0.563	0.001 -0.151	0.564 0.896	0.032 -0.054
2	PmCIRE12 - JF746889	(gt)7	F: TCAAACGAAGCCATTGAT R: AGATGATGAGAGCGAAGC	NED	255	251-253	54.4	LA PD	2 2	60 32	0.369 0.405	0.350 0.375	0.053 0.075	0.350 0.455	0.133* 0.017
2	PmCIRE5 - JF746881	(gt)10	F: ACTCCACACTAGCGACCA R: TGCATGAAATCAACCTAATG	VIC	144	132-142	54.8	LA PD	3 2	62 32	0.079 0.091	0.081 0.094	-0.027 -0.033	1.000 1.000	-0.003 -0.004
2	PmCIRF5 - JF746883	(ag)18	F: TTCAATACTTCCATCGTATCAA R: AGAGGACGAAATGGGGTA	FAM	183	181-185	55.2	LA PD	3 3	61 32	0.225 0.412	0.213 0.375	0.052 0.092	0.368 0.296	0.054* 0.022

### III.2. Diversité et structure génétique des populations de *P. mangiferae* à l'île de la Réunion

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la diversité et la structuration génétique de la cécidomyie des fleurs du manguier *P. mangiferae* sur l'île de la Réunion en fonction de facteurs biotiques et abiotiques.

Les espèces du genre *Procontarinia* sont toutes strictement inféodées au manguier. Elles sont spécifiques d'un seul organe, exceptée *mangiferae* qui s'attaquent aux inflorescences et aux jeunes feuilles (Raman 2012). Dans la littérature, certains insectes comme le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* Harris (Homoptera : Aphididae) ont montré des capacités à changer de plante-hôte après une invasion (Peccoud *et al.* 2008). Après son introduction, des lignées de ce puceron se sont adaptées à des plantes endémiques du Chili mais qui appartenaient au même genre que leur plantes hôtes d'origine. A la Réunion, il n'existe pas d'autres espèces d'arbres du genre *Mangifera* mais nous avons vérifié l'absence de *P. mangiferae* sur trois autres arbres de la même famille (Anacardiaceae). Un à deux pièges, identiques à ceux utilisés pour le suivi des populations (voir le paragraphe *Population dynamics survey*), ont été installés sous des inflorescences d'un anacardier (*A. occidentale*) et de deux pruniers de Cythère (*S. cytherea*) pendant l'hiver 2010. Cinq pièges ont été placés pendant 14 mois sous des jeunes pousses ou inflorescences de faux poivriers (*S. terebinthifolius*), une espèce très fréquente dans les haies autour des manguiers. Aucune larve de *P. mangiferae* n'a été collectée, confirmant l'absence d'un changement d'hôte au moins sur ces espèces phylogénétiquement proches du manguier et régulièrement présentes à proximité des vergers.

A la Réunion, la cécidomyie des fleurs du manguier est mentionnée du nord au sud de l'île, principalement dans la zone de production du manguier, et des mois de juin (inflorescences) à novembre (feuilles) (Hugon 1979; Vincenot & Normand 2009). Par ailleurs, plusieurs types de galles sur inflorescences et sur pousses végétatives sont signalés par Hugon (1979) qui suppose la présence de plusieurs espèces. La structure des populations peut être influencée par des facteurs biotiques tels que l'organe et la variété de manguier mais aussi par des facteurs abiotiques tels que le climat et le relief. L'île de Réunion offre la possibilité d'étudier l'impact de ces facteurs sur la structure des populations dans un contexte isolé sans introduction de populations extérieures.

Cette étude répond à cinq questions :

- Combien y-a-t-il d'espèces du type « cécidomyie des fleurs » à la Réunion c'est-à-dire ayant une phase au sol ?
- *P. mangiferae* est-elle présente seulement dans la zone de production de mangues ou aussi dans sur des manguiers isolés hors de la zone de production?

- *P. mangiferae* est-elle présente seulement en hiver ou bien toute l'année ?
- Quelle est la diversité génétique de *P. mangiferae* et est-ce que ses populations sont structurées en fonction de facteurs biotiques (organes du manguier, variétés) ou abiotiques (saisons, sites) ?
- Est-ce que les caractéristiques de *P. mangiferae* peuvent expliquer son caractère invasif ?

Pour répondre à ces questions, un échantillonnage a tout d'abord été réalisé sur toute l'île, sur inflorescences et jeunes feuilles, sur différentes variétés de manguier, en milieu cultivé et non cultivé, et à différentes saisons. Ensuite, un suivi des populations a été réalisé pendant 14 mois dans un verger de la zone de production. L'étude génétique a été réalisée à l'aide des onze marqueurs SSR développés et d'une séquence du gène mitochondrial Cytochrome Oxydase I (COI) (Yukawa *et al.* 2003) qui avait déjà été utilisée pour deux autres espèces du genre *Procontarinia* (Kolesik *et al.* 2009). Les effets des facteurs biotiques et abiotiques sur la structure des populations ont été testés par des analyses moléculaires de variance. Trois logiciels ont été utilisés pour inférer la structure des populations par clustering à partir des données microsatellites. De plus, cinquante et un individus représentatifs de l'échantillon total ont été séquencés pour le gène mitochondrial COI et comparés entre eux et avec trois autres espèces de *Procontarinia*.

Ces analyses ont montré qu'une seule espèce était présente toute l'année en verger, qu'elle se reproduisait à la fois sur les inflorescences et les jeunes feuilles, quelles que soient les conditions climatiques ou culturelles. Par ailleurs, les populations à l'île de la Réunion sont structurées en deux clusters en sympatrie qui sont présents dans chaque localité mais en proportion différentes. Un cluster est plus fréquent dans la zone de culture du manguier. Toutefois, les effets respectifs de la zone de culture et du climat restent confondus en raison du cantonnement des vergers dans la zone Ouest et Sud de l'île. Ce travail met en perspective les capacités d'adaptation de cette espèce monophage du manguier.

Cet article est publié online depuis janvier 2013 dans Biological invasion sous la référence : DOI 10.1007/s10530-012-0400-0.

(Modification du 03 septembre 2013) La référence complète de l'article est :

Amouroux P, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2013) Invasive mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations. Biological Invasions 15 (8):1677-1693.

**ARTICLE B: Invasive mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations.**

P. AMOUROUX<sup>1,2,3</sup>, F. NORMAND<sup>1</sup>, S. NIBOUCHE<sup>4</sup>, H. DELATTE<sup>4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD, UPR HortSys, F-97455 Saint-Pierre, La Réunion, France

<sup>2</sup> Corresponding author, e-mail: paul.amouroux@cirad.fr

<sup>3</sup> Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France.

<sup>4</sup> CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France.

**Keywords:** Ecological genetics, Invasive pest species, Insects, Agriculture, Cecidomyiidae.

***Abstract***

Mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (= *Erosomyia mangiferae* Felt), is an invasive pest that causes economic damage worldwide. The objectives of our study were to highlight the genetic and ecological abilities of this monophagous gall midge to invade new habitats and to evaluate its genetic structure on an isolated island. This study, carried out in subtropical Reunion Island, is based on data from population dynamics surveys and from molecular analyses (mitochondrial DNA and microsatellites). Using 11 microsatellite loci and an extensive sampling of 27 populations at 17 sites, we tested the genetic differentiation between populations sampled on different mango organs and cultivars at different seasons and under different climatic and cultural environments. We checked for the existence of a seasonal bottleneck. Our results showed that a single species, *P. mangiferae*, was present all year round with no genetic bottleneck at any of the sites sampled, regardless of the climatic and cultural conditions, and that it fed on inflorescences and young leaves. These characteristics showed the ecological plasticity of *P. mangiferae*, despite its low genetic diversity and, consequently, the invasive potential of this species. Populations in Reunion Island are structured into two clusters in sympatry and present in different proportions at each site. One cluster was more frequently found in the cultivated mango area. This work provides insights into the relationships between gall midges and tree host plants in a subtropical agro-ecosystem, as well as into the role of the population genetic structure in the establishment process of a monophagous invasive cecid fly.



## Introduction

Successful invasions are characterized by the match between the invader and its new habitat, which may involve a combination of several strategies (Facon *et al.* 2006). Genetic structure and life history traits contribute to the success of invaders. Genetic diversity, provided by large founding populations or multiple introductions, allows local adaptation in the new habitat (Dlugosch & Parker 2008; Kolbe *et al.* 2004; Suarez & Tsutsui 2008). Insects provide numerous models for studying biological and ecological factors that influence the ability of some species to become established and spread within new environments (Boubou *et al.* 2011; Perdereau *et al.* 2011).

Following the introduction of a species into a new environment, the invaders are able to evolve rapidly into the new region in isolation from other individuals of the species (Launey *et al.* 2010; Lee 2002). Rapid loss of genetic diversity in the derived founder population can occur under the combined effect of genetic bottleneck and genetic drift (Nei *et al.* 1975). Classical population genetics invokes multiple factors to explain population genetic structure. First, geographical features can represent barriers to migration and/or population expansion and generate patterns that structure the genetic diversity (Launey *et al.* 2010). Second, for phytophagous insects, genetic changes may be required for some host plant shifts or host range expansions (Tabashnik 1983). The population genetic structure can then be modified by life history traits such as dispersal capacity (Phillips *et al.* 2006), mating system, which is a genetic link between generations, population size fluctuation, which enhances genetic drift during small-sized generation, and the presence of diapausing individuals, like a seed bank in the soil, which are expected to offset the effects of drift (Castillo 1994). Lastly, endosymbiont bacteria such as *Wolbachia* spp. can manipulate the post-zygotic reproduction of their host and induce host speciation (Sun *et al.* 2011). The mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt), is a worldwide invasive monophagous pest that was recently introduced in several countries and is, therefore, a good model for studying its population genetic structure with regard to these factors.

Cecidomyiidae, commonly referred to as gall midges, are one of the largest families of nematoceros Diptera, with more than 6,024 described species, and many more undescribed and unknown species worldwide (Gagné 2010). Among these species, 45 are immigrant (Gagné 2010) and many of them are pests of crops, ornamental plants and forest trees worldwide (Dorchin 2008). Annual crop pests are the most frequently studied species and include the Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say), a wheat gall midge that was the first invasive insect to cause economic havoc in the USA (Stuart *et al.* 2008). The life cycle of Cecidomyiidae is closely associated with the phenology of their host plant, and gall midges have several adaptive synchronization strategies including diapause (Uechi & Yukawa 2006; Yukawa 2000). They are most often restricted to one organ of a single host plant (Gagné

1989; Jones *et al.* 1983) and are less often oligophagous within a single plant genus (Gagné 2004).

The genus *Procontarinia* contains 15 species, all of which are associated with mango, *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) (Gagné 2010). Since invasion success has often been linked to diet breadth, herbivores that feed on numerous plant species have the highest probability of finding a suitable host plant (Ward & Masters 2007). However, despite their strict association with mango, the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt), and the mango leaf gall midge, *P. matteiana* Kieffer & Cecconi, are found worldwide. *P. mangiferae* is considered to be indigenous to India and invasive in Thailand, Mauritius, Reunion Island, Iran, the West Indies and Brazil (CAB 2004; Gagné 2010). This species was described several times and consequently it has several synonyms: *Erosomyia mangiferae* Felt 1911, *Mangodiplosis mangiferae* Tavares 1918, *Rhabdophaga mangiferae* Mani 1938 and *Erosomyia indica* Grover 1965 (Gagné & Medina 2004). This species is a serious pest that reduces potential fruit yield by more than 70% (Etienne 1977; Peña *et al.* 1998; Whitwell 1993). It is currently the major pest of mango flowers in Reunion Island (Amouroux & Normand 2010). Each female, with a life span of two or three days, can lay up to 150 eggs on mango inflorescences. After hatching, larvae penetrate the mango organ, leave the organ at the final instar, fall to the ground and bury themselves in the soil. Adult gall midges emerge from larvae buried in the soil and induce serious outbreaks during mango flowering, from the equatorial to the subtropical regions of India (Prasad 1971). The cycle lasts from between 14 to 25 days (Pezhman & Askari 2004). Larvae enter into diapause in tropical regions at the end of the flowering period, but permanent populations exist in the equatorial regions where mango flowering may occur all year round. The biotic and/or abiotic conditions that induce diapause are unknown (Prasad & Grover 1974).

*P. mangiferae* is the only *Procontarinia* species able to feed on different organs of mango, inflorescences and young leaves, inducing different types of galls (Online Resource 1). Other *Procontarinia* species are restricted either to leaves or to fruits. Raman *et al.* (2009) hypothesized that this characteristic could be indicative of subtle radiation within this species. Indeed, host shifts frequently result in host races (Carletto *et al.* 2009), cryptic species (Blair *et al.* 2005) or sibling species (Malausa *et al.* 2007) in the case of phytophagous insects. Gall midges also provide examples of radiation. Cook *et al.* (2011) reported cryptic species of *Dasineura oxycoccana* (Johnson) between two host plant species of the genus *Vaccinium*. Some clades of the genus *Asphondylia* have radiated from their host plant, *Larrea tridentate* (Sesse & Moc. ex DC.) Coville, by shifting to new organs and by changing their phenology (Joy & Crespi 2007). Stireman *et al.* (2008) also observed that four cryptic lineages of the gall midge, *Asteromyia carbonifera* (Osten Sacken), existed on goldenrod leaves without phenological isolation. However, the existence of two lineages associated with either inflorescences or leaves has never been tested for *P. mangiferae*.

Mango was introduced in Reunion Island in 1770 from India (Le Bellec & Renard 1997). Etienne and Roura (1974) mentioned the presence of *P. mangiferae* in 1974 for the first time. However, its date of introduction is unknown. Hugon (1979) confirmed the presence on the island of *P. matteiana* on leaves and *P. mangiferae* on inflorescences, and observed two other types of gall on leaves and stems without identifying the species, suggesting that other gall midges could be present in Reunion Island.

The objective of our study was to highlight the genetic and ecological abilities of this monophagous gall midge to invade new habitats, and to evaluate its genetic structure on an isolated island. Field population dynamics surveys and molecular analyses were performed in order to find answers to the following five questions. Is *P. mangiferae* the unique blossom gall midge species present on mango in Reunion? Is *P. mangiferae* present only in the mango production area, or in all areas where mango is present? Is *P. mangiferae* present seasonally during the mango flowering period, or is it permanently present thanks to its ability to feed on young leaves? How can *P. mangiferae* genetic diversity be characterized and are the populations genetically structured according to biotic (mango organs, cultivars) or abiotic (seasons or sites) factors? Does *P. mangiferae* have specific traits linked to invasiveness?

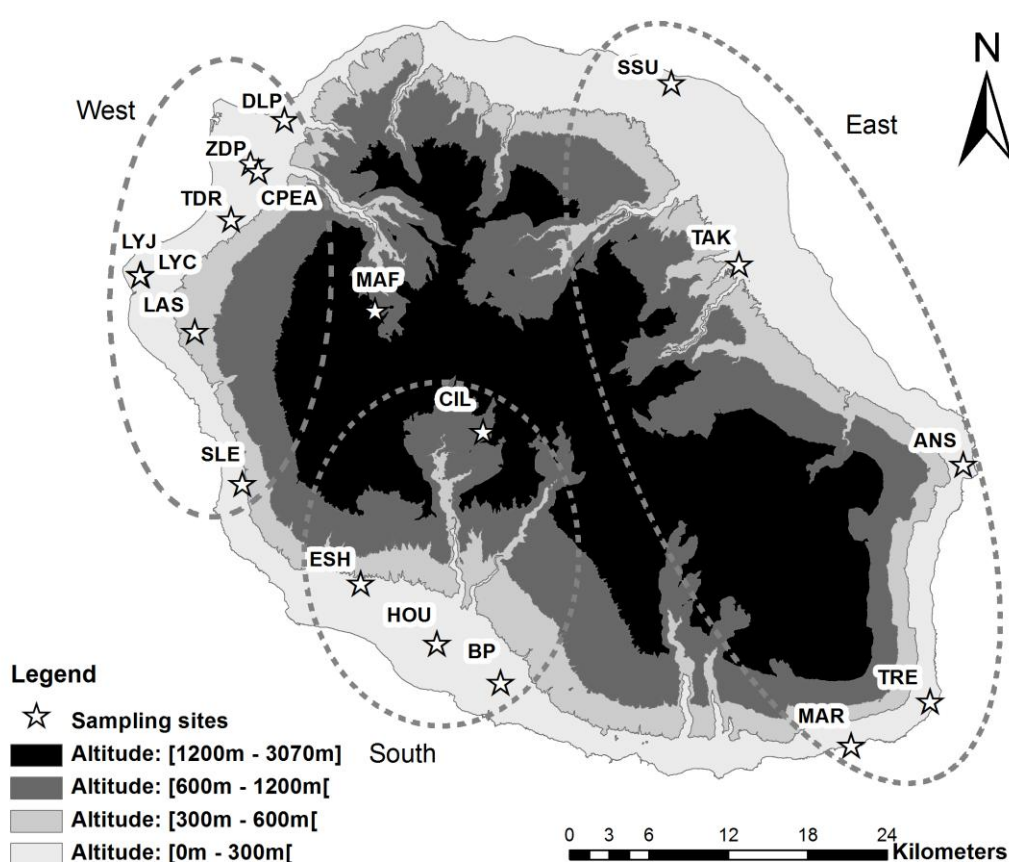
### **Materials and methods**

#### **Ecological context**

Reunion Island is located near the Tropic of Capricorn in the Indian Ocean (21°06'S, 55°29'E). It is a sub-tropical island with a diversity of climates due to a wide range of elevations with high mountains culminating at more than 3,000 m a.s.l. (Figure 1), and to trade winds that induce contrasted rainfalls between the windward east coast and the leeward west coast. At low altitudes (< 1,000 m a.s.l.), annual rainfall ranges from 500 to 1,500 mm on the west coast and from 2,000 to 5,000 mm on the east coast (Raunet 1991). The cool months, from July to September, are generally dry. Their monthly mean minimum and maximum temperatures at sea level are 17.7 and 25.8°C, respectively. The hot and rainy months, from January to March, have monthly mean minimum and maximum temperatures at sea level of 22.6 and 30°C, respectively (Raunet 1991). Commercial mango orchards expanded quickly from less than 50 ha in 1970 to more than 300 ha today on the west and southwest coasts suitable for mango cultivation (Vincenot & Normand 2009). However, mango trees are present all over the island, up to 1,000 m a.s.l., in the backyards of homes and along roadsides. Mango flowering occurs from July to October. Vegetative growth begins sporadically during flowering and fruit growth and flushes after harvest, from January to April. A vegetative rest period occurs from April to June.

## Field sampling for genetic studies

Twenty-seven populations of 28 to 35 final instar larvae were collected at 17 sites across Reunion Island (Table 1, Figure 1). Each site was sampled one to four times during the winter 2009 (June to October) and the summer 2011 (February) (Table 1). Sampling was carried out in commercial orchards (cultivars ‘Cogshall’ and ‘José’) or on isolated trees in backyards and along roadsides (unknown cultivar). Ten trees were randomly chosen in commercial orchards, and three to ten trees in non-cultivated areas. Three to ten larvae per tree were randomly sampled from infested inflorescences or young leaves, depending on the site and the season. Larvae were stored in 96° ethanol at -20°C.



Chap. III - Figure 1: Location of sampling sites of *P. mangiferae* on Reunion Island. See Table 1 for detailed information about the population codes. Altitude is indicated by shades of gray. Dotted lines delineate the three main geographical and ecological areas.

Chap. III - Table 1: Characteristics of the 28 sites where *P. mangiferae* populations were sampled: site name, population code (Fig. 1), area (E: Eastern, S: Southern, W: Western), altitude, environment around sample sites, cultivar (unknown in natural area), organ (I: Inflorescence, L: Leaf), season (W: Winter; S: Summer), sampling month and number (N) of individuals genotyped. The asterisks in the last column indicate the sites where individuals were chosen for phylogenetic analyses. At Mafate, the five individuals sampled were only used for phylogenetic analyses.

Site name	Population code	Area	Altitude (m a.s.l.)	Environment	Cultivar	Organ	Season	Month	N	
Bois Blanc	ANS	E	115	Natural	Unknown	I	W	08	31	*
Bassin plat	BP1	S	145	Cultivated	Cogshall	I	W	07	31	*
	BP2					I	W	09	32	
Palmiste rouge	CIL	S	975	Natural	Unknown	I	W	09	32	*
	CPEA1					I	W	08	31	
Lycée Agricole	CPEA2	W	135	Cultivated	Cogshall	I	W	09	32	*
	CPEA3					I	W	10	30	
	CPEA4					L	S	02	31	
La Possession	DLP	W	40	Cultivated	José	I	W	08	32	
Etang-Salé	ESH	S	210	Cultivated	José	I	W	07	32	
Ouaki	HOU	S	90	Cultivated	José	I	W	08	32	
La Saline	LAS	W	485	Natural	Unknown	I	W	09	31	*
	LYC1					I	W	07	30	
Saint-Gilles	LYC2	W	70	Cultivated	Cogshall	I	W	09	32	*
	LYC3					L	S	02	34	
Saint-Gilles	LYJ1	W	60	Cultivated	José	I	W	07	32	*
	LYJ2					I	W	10	30	
Mafate	MAF	-	1080	Natural	Unknown	I	W	10	5	*
Mare longue	MAR	E	10	Natural	Unknown	I	W	09	30	*
Saint-Leu	SLE	W	250	Cultivated	Cogshall	I	W	08	34	*
	SSU1					I	W	08	28	
Sainte-Suzanne	SSU2	E	5	Natural	Unknown	L	W	08	32	*
	SSU3					L	S	02	31	
Takamaka	TAK	E	240	Natural	Unknown	I	W	08	30	*
Tour des roches	TDR	W	1	Cultivated	Cogshall	I	W	08	32	*
Tremblet	TRE	E	40	Natural	Unknown	I	W	09	31	
Piton	ZPD1	W	115	Cultivated	josé	I	W	07	35	*
Defaud	ZPD2					I	W	09	30	

## Population dynamics survey

Quantitative surveys were conducted in one commercial mango orchard (LYJ, cultivar ‘José’) located on the dry west coast, the main mango production area (Figure 1, Table 1). Populations of larvae that fell from mango trees were quantified with funnel-shaped traps (diameter: 28 cm) filled with water and placed on the ground under susceptible organs: inflorescences or elongating vegetative growth units (portion of stem bearing 10 to 15 leaves). One trap was placed under each of 20 randomly selected trees. The number and type of susceptible organs present vertically above the trap were recorded. From June to October 2010 (flowering period), the number of larvae per trap was recorded twice a week. Trapping was carried out for one week each month from November 2010 to June 2011 (vegetative growth period), under five to ten trees bearing susceptible organs. Qualitative surveys were conducted on two other orchards, the first one in the dry western area (CPEA, cultivar ‘Cogshall’) and the second one on the southern area (BP, cultivar ‘Cogshall’). The presence of *P. mangiferae* damage on young leaves and on inflorescences was recorded each month on all the trees with inflorescences or young leaves in all three orchards.

## Species identification: morphological criteria and mitochondrial DNA sequencing

To obtain adult gall midges for morphological identification, final instar larvae were trapped from inflorescences as described above at the CPEA orchard (cultivar: ‘Cogshall’: season: winter), and from young leaves (season: summer) and inflorescences (season: winter) at the LYJ orchard (cultivar: ‘José’). These larvae were placed in sterile sand at 20°C under a constant photoperiod (LD 12:12). Just after emergence, ten males and ten females were stored in 70° ethanol. These samples were prepared according to the method developed by Pierre (2011), and were identified using the description of Felt (1918) and Gagné (1994).

For mitochondrial DNA analysis, a fragment of the cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene (Yukawa *et al.* 2003) was sequenced for 51 *P. mangiferae* individuals. These individuals were chosen from among those collected for microsatellite genotyping in order to encompass a large diversity of conditions. They were taken from 15 populations collected at 13 sites: 26 individuals collected in mango orchards (20 from the cultivar ‘Cogshall’ and six from the cultivar ‘José’) and 25 collected on wild trees; 40 individuals collected on inflorescences and 11 on leaves; 43 individuals collected in winter and eight in summer; 26 individuals collected in the western area, 16 in the eastern area and nine in the southern area; and 19 individuals assigned by STRUCTURE to cluster A and 20 to cluster B (see Results). We also sequenced the COI gene for three *P. matteiana* adults that emerged from the leaves of two mango trees collected in the LYC orchard. The primers used for the amplification were as follows: forward; 5’-GGATCACCTGATATAGCATTC-3’(COIS) and reverse; 5’-CCCGGTAAAATTAATAAATAAATTC-3’(COIA) (Funk *et al.* 1995). The PCR was

performed in a final volume of 25  $\mu$ L, including 2  $\mu$ L of DNA, 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.5 of Taq-DNA-polymerase, 1.5  $\mu$ L of  $MgCl_2$  (25 mM), 2  $\mu$ L of dNTP (2.5 mM), 5  $\mu$ L of buffer 5X (Promega, Colorless GoTaq® Flexi Buffer) and completed with HPLC water. We used the following procedure for amplification: denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles consisting of 60 s of denaturation at 94°C, 50 s of hybridization at 54°C, and 120 s of elongation at 72°C. PCR products were sent to Macrogen, Inc. (Seoul, Korea) for purification and sequencing. The nucleotide sequence data reported in this paper were deposited in the GenBank nucleotide sequence database with the accession numbers JQ823184 - JQ823234 for *P. mangiferae* and JQ823235 - JQ823237 for *P. matteiana*.

Sequences of the COI gene of two other mango gall midge species available from GenBank were used as outgroups in this analysis: *P. mangicola* (Shi) (accession numbers AB438110 to AB438112) and *P. pustulata* (accession numbers FJ820163 to FJ820172). The analyses were performed on 370 bp fragments shared by the four species (sizes corresponding to fragments after alignment). First, sequences were aligned in FASTA format using MEGA and CLUSTALW (Tamura *et al.* 2007). Sequences were then opened in PAUP 4.0b10 (Swofford 1998) and the NJ tree was built using the JC69 model of evolution. Then, 56 models of evolution were tested. Results of this analysis were tested with MODELTEST 3.8 software (Posada & Crandall 1998) on the Web ([http://darwin.uvigo.es/software/modeltest\\_server.html](http://darwin.uvigo.es/software/modeltest_server.html)). For each data partition, the best-fitting model of nucleotide evolution was determined using the Akaike Information Criterion as implemented in MODELTEST 3.8. In maximum likelihood searches, values of parameters for rate matrices, site heterogeneity and invariance were estimated by MODELTEST on a neighbor-joining tree. Likelihood settings from the best-fit model were TVM+I, corresponding to the parameter Lset = 6 on the MRBAYES analysis. MRBAYES 3.1 was used for Bayesian phylogenetic inference (Ronquist & Huelsenbeck 2003). In all the analyses, four Markov chains were allowed to sample parameters and tree topologies every 1,000 generations for 4,000,000 generations. At the end of each run, the average standard deviation of split frequencies was below 0.007. Visual inspection of sampled parameter values with TRACER (Tracer 2003-2006, MCMC Trace File Analyser, A. Rambaut and A. Drummond, University of Oxford, UK) showed that values typically stabilized after 15,000 generations; the first 100,000 generations were discarded as a conservative burn-in. For each Bayesian analysis, TRACER was also used to check that the autocorrelation between samples was limited enough to produce effective sample sizes that were greater than 800 for each parameter. Runs of each analysis performed with MRBAYES converged with PSRF values at 1. Trees were visualised with FIGTREE (FigTree, 2006-2009, A. Rambaut).

### Microsatellites analysis

Whole genome DNA of the 848 larvae was extracted according to a protocol modified from Delatte *et al.* (2005). Ninety-six larvae were individualized in a 96-well microplate.



Each well was filled with 25 µL of buffer (10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 0.45% Tween 20, 0.45% Nonidet P40 and proteinase K to a final concentration of 500 µg/mL). The microplate was hermetically sealed and placed in an oven at 65°C overnight. The following day, the microplate was briefly centrifuged and 35 µL of HPLC water was added to each well. Following the protocol and the microsatellite loci described by Amouroux *et al.* (2012), each individual was genotyped at 11 microsatellite loci: PmCIRB12, PmCIRB10, PmCIRB6, PmCIRC12, PmCIRC62, PmCIRD12, PmCIRD8, PmCIRE11, PmCIRE12, PmCIRE5, PmCIRF5 (Online Resource 2). Electrophoretic analyses were conducted on an automated ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Alleles were scored using Genemapper version 2.5 software (Applied Biosystems).

The diversity of microsatellite loci within each population was estimated using the observed heterozygosity ( $H_{obs}$ ) and Nei's (1987) unbiased expected heterozygosity ( $H_{n.b.}$ ) computed using GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.* 1996). Significance of linkage disequilibrium between pairs of loci was tested with the Fisher's test in GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). Single and multilocus fixation indices ( $F_{is}$ ) were estimated according to Weir and Cockerham (1984). Deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using a two-tailed Fisher's exact test in GENEPOP. We corrected for multiple testing using the Bonferroni correction. The MICROCHECKER program, version 2.2 (Van Oosterhout *et al.* 2004), was used to determine whether the departures from HWE were due to the presence of null alleles or to genotyping errors. Genetic discontinuities between samples from mango organs (inflorescences vs. leaves), mango cultivars ('José', 'Cogshall', unknown), areas (western, southern, eastern), and seasons (summer vs. winter) were quantified through hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) with nonparametric permutation procedures using ARLEQUIN software, version 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). The BOTTLENECK program, version 1.2 (Cornuet & Luikart 1996), was used to detect heterozygote excess for individual populations, considering a two-phase model (TPM) of microsatellite mutation, a 70% stepwise-mutation model (SMM) and a 30% infinite allele model (IAM), and 1,000 replications. FREENA (Chapuis & Estoup 2007) was used to estimate null allele frequencies, to calculate pairwise estimators of  $F_{ST}$  (Weir 1996) and to apply the ENA correction. The corrected estimator is designated as  $F_{ST}^{ENA}$ . The genotypic differentiation between pairs of populations was tested using a Fisher's exact test in GENEPOP, corrected with the Bonferroni correction for multiple testing.

Levels of population admixture were quantified using three Bayesian clustering procedures as implemented in STRUCTURE 2.3 (Pritchard *et al.* 2000), TESS 2.3 (Chen *et al.* 2007) and BAPS 5.2 (Corander *et al.* 2008). With STRUCTURE, the admixture model was used to analyze  $K = 1$  to 20 clusters, with ten runs for each  $K$ , 1,000,000 replicates, and a 100,000 replicate burn-in. Default values were used for all other parameters. The number of clusters was determined by the Evanno *et al.* (2005) method. A correspondence analysis (COA) was

performed with GENETIX 4.05 to visualize the localization of the clusters identified by STRUCTURE along the two first axes that describe the genetic diversity of the whole population. For each single population, the allelic diversity (mean number of alleles per locus) within each cluster was also estimated. The proportion of individuals assigned to a cluster by STRUCTURE was compared between areas using multiple comparison procedures for binomial generalized linear models developed by Bretz et al. (2011). These analyses were conducted with R software, version 2.13.1 (R Development Core Team 2011), with the ‘multcomp’ library. Using TESS, we initially determined the number of clusters K with the BYM admixture model, 20 runs per K ranging from 2 to 10, 10,000 sweeps and 1,000 burn-ins. Ten “dummy” individuals were added to represent the upper mountains of Reunion Island (without mango) where no population could be sampled (Durand *et al.* 2009). The number of clusters was determined using the maximum likelihood. Then, for the best K, we used 50 independent runs with 50,000 sweeps and 10,000 burn-ins. CLUMPP v.1.1 (Jakobsson & Rosenberg 2007) was used to average the assignment scores over the ten best runs for STRUCTURE and over the five best runs for TESS. The graphics of assignment scores were generated by DISTRICT (Rosenberg 2004). With BAPS, we estimated clusters using the spatial clustering of groups for population mixture analysis. Ten repetitions were computed for each  $K_{\max} = 3, 5, 10, 15, 20$ . According to the logarithm of marginal likelihood, 100 repetitions of the best number of clusters were performed to determine the best partition.

## Results

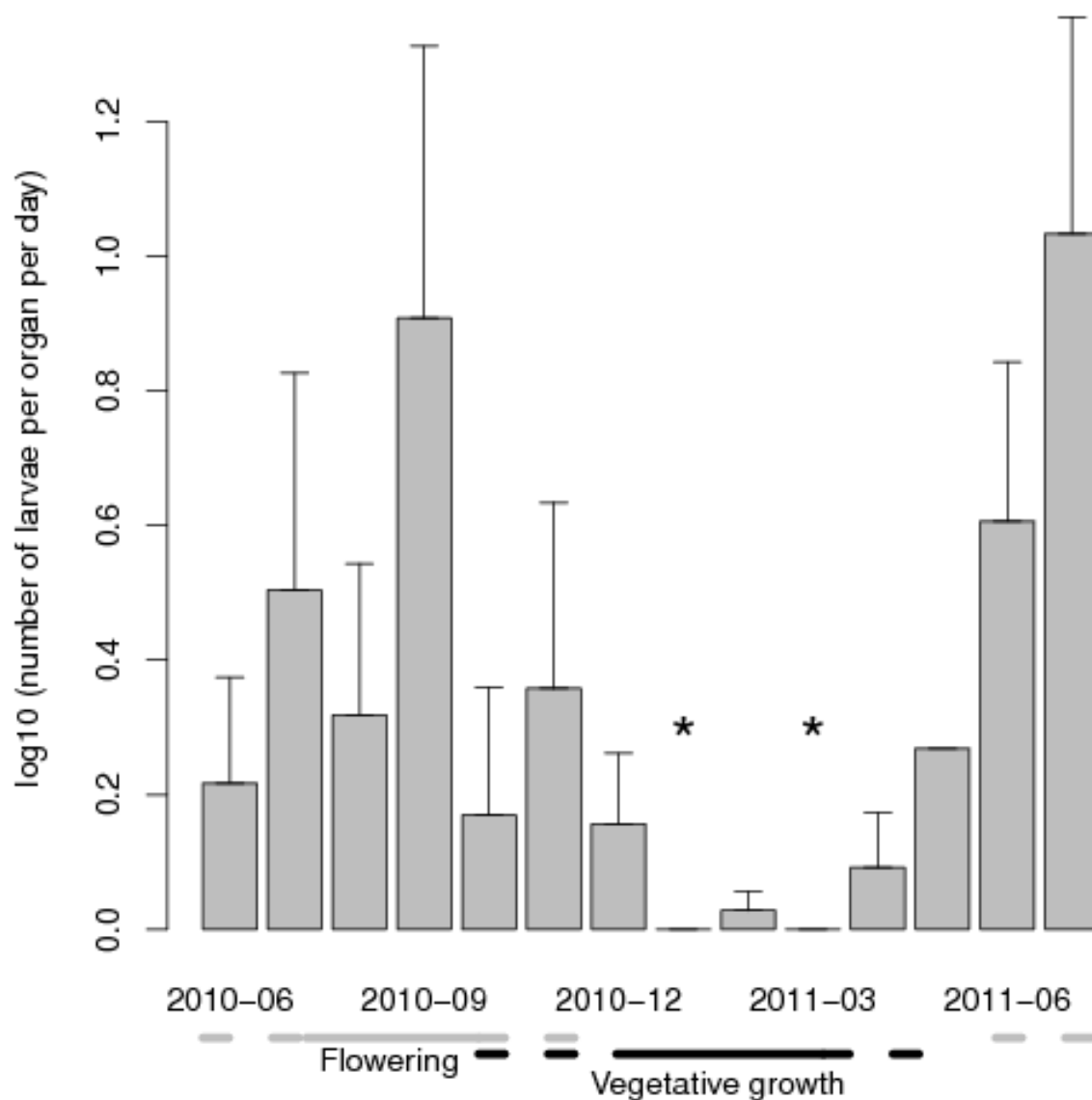
### Species identification

Based on morphological characteristics, adults collected at two sites, two seasons and two organs were all identified as *P. mangiferae* (E. Pierre, pers. comm.). Phylogeny analysis, based on COI mtDNA of 51 *P. mangiferae* specimens and 16 other individuals from three *Procontarinia* species, clearly distinguished the four species (Online Resource 3). *P. mangiferae* sampled in Reunion Island showed a homogeneous sequence of the COI mitochondrial gene, except for four individuals that exhibited a sequential variation of one nucleotide (different for each individual).

### Population dynamics survey

The qualitative survey of mango blossom gall midges in three commercial orchards showed the presence of damage by *P. mangiferae* all year round. Monthly variations of the population density of *P. mangiferae* in the LYJ orchard are presented in Figure 2. Larvae were trapped both from inflorescences during flowering and from young leaves during vegetative growth. Mango flowering, from June to October, corresponded to the highest population density. The monthly larval density ranged from 0.5 to 9.8 larvae trapped per inflorescence per day. During vegetative growth, from November to May, the monthly larval density ranged from 0.1 to 1.3 larvae trapped per vegetative growth unit per day. Fresh galls

were then limited to some scattered young leaves and the number of larvae per organ was the lowest.



Chap. III - Figure 2: Population dynamics of the final instar larvae of *P. mangiferae* from June 2010 to July 2011 at the LYJ orchard in Saint-Gilles. Means and standard deviations were log<sub>10</sub>-transformed. Asterisks (\*) indicate observations of damage without trapped gall midges. Below the x-axis, the mango cycle is described by gray and black lines, for flowering and vegetative growth, respectively.

Chap. III - Table 2: Mean (standard deviation) value of parameters characterizing the genetic variability of 27 populations of *P. mangiferae* on Reunion Island (location code according to Table 1), based on the analysis of 11 polymorphic microsatellite loci. Average number of alleles per locus;  $H_{n.b.}$ : expected unbiased heterozygosity;  $H_{obs.}$ : observed heterozygosity;  $F_{is.}$ : Weir & Cockerham's (1984) estimate of Wright's (1951) fixation index; proportion of missing data; mean estimated proportion of null alleles.

Population code	Average number of allele per locus	$H_{n.b.}$	$H_{obs.}$	$F_{is.}$ (FSTAT)	Proportion of missing data	Mean estimated proportion of null allele
ANS	2.45	0.187 (0.221)	0.135	0.034	0.000	0.058 (0.065)
BP1	2.36	0.209 (0.249)	0.153	0.048	0.000	0.049 (0.107)
BP2	2.27	0.227 (0.221)	0.173	0.034	0.000	0.053 (0.084)
CIL	2.36	0.197 (0.239)	0.154	-0.005	0.020 (0.025)	0.048 (0.085)
CPEA1	2.91	0.296 (0.216)	0.194	0.347*	0.015 (0.022)	0.094 (0.098)
CPEA2	2.82	0.273 (0.245)	0.193	0.296*	0.009 (0.015)	0.086 (0.080)
CPEA3	2.91	0.263 (0.208)	0.209	0.209*	0.018 (0.026)	0.065 (0.084)
CPEA4	2.91	0.247 (0.232)	0.203	0.183	0.012 (0.017)	0.045 (0.064)
DLP	2.82	0.274 (0.232)	0.228	0.005	0.009 (0.015)	0.074 (0.083)
ESH	2.36	0.207 (0.239)	0.137	0.103	0.003 (0.009)	0.075 (0.084)
HOU	2.09	0.208 (0.219)	0.199	-0.145	0.000	0.042 (0.071)
LAS	2.82	0.279 (0.251)	0.221	0.041	0.026 (0.040)	0.078 (0.095)
LYC1	2.91	0.282 (0.239)	0.188	0.336*	0.000	0.096 (0.111)
LYC2	2.45	0.243 (0.236)	0.187	0.237*	0.028 (0.033)	0.077 (0.078)
LYC3	3.18	0.308 (0.238)	0.227	0.267*	0.083 (0.098)	0.084 (0.082)
LYJ1	2.91	0.241 (0.237)	0.184	0.241*	0.003 (0.009)	0.061 (0.082)
LYJ2	2.82	0.246 (0.272)	0.192	0.223	0.012 (0.017)	0.060 (0.074)
MAR	2.27	0.229 (0.228)	0.106	0.289*	0.003 (0.010)	0.100 (0.111)
SLE	3.00	0.264 (0.219)	0.177	0.162	0.086 (0.108)	0.086 (0.089)
SSU1	2.36	0.202 (0.241)	0.159	0.217	0.000	0.039 (0.065)
SSU2	2.27	0.237 (0.245)	0.193	0.186	0.000	0.066 (0.100)
SSU3	2.45	0.268 (0.248)	0.248	0.073	0.012 (0.016)	0.038 (0.061)
TAK	2.36	0.187 (0.199)	0.134	0.045	0.006 (0.013)	0.065 (0.084)
TDR	2.36	0.234 (0.233)	0.190	-0.006	0.003 (0.009)	0.069 (0.090)
TRE	2.18	0.167 (0.214)	0.144	-0.103	0.000	0.030 (0.066)
ZPD1	3.00	0.259 (0.197)	0.191	0.264*	0.013 (0.023)	0.074 (0.104)
ZPD2	2.36	0.218 (0.252)	0.180	0.179	0.018 (0.031)	0.042 (0.064)

\* multilocus deviations from HWE (experiment-wise  $P < 0.05$  after Bonferroni correction)

### Within-population genetic variability

The analysis of 11 microsatellite loci in 27 populations of *P. mangiferae* (n = 848) revealed a low genetic variability, with a mean number of alleles per locus ranging from 2.09 to 3.18, and an observed heterozygosity ( $H_{n.b.}$ ) ranging from 0.106 to 0.228 (Table 2). Multilocus estimates of  $F_{is}$  ranged from -0.103 to 0.347 and showed significant heterozygote deficiencies in nine out of 27 populations. The average proportion of missing data per locus ranged from 0 at locus PmCIR-E5 to 0.042 (SD = 0.063) at locus PmCIR-E11, while the average proportion of missing data per population ranged from 0 in eight populations to 0.086 (SD = 0.108) in the SLE population. The average estimated proportion of null alleles was low (0.065; SD = 0.019). Exact tests for genotypic disequilibrium resulted in six significant values ( $P < 10^{-4}$ ) for the PmCIR-E12 and PmCIR-F5 loci in three populations (LYC2, MAR and ZPD1), for PmCIR-C12 and PmCIR-B12 in one population (HOU), and for PmCIR-D8 and PmCIR-F5 in one population (BP1).

The largest proportion of the overall molecular variance was due to variation within populations (Table 3, range: 98.9-99.3%,  $P < 0.001$ ). The effect of the area (western, eastern, southern) was significant but the percentage of explanation of the variance was only 0.26%. The effects of cultivars, organs and seasons were not significant. The various tests of heterozygosity deficit proposed in BOTTLENECK (Sign test and Wilcoxon test, TPM model) suggested a significant deficit of heterozygosity with the SMM model in 11 populations (ten populations sampled in winter and one population in summer), indicating that these populations were in expansion. No significant heterozygosity excess was detected in the 27 populations. The low differences between  $H_{n.b.}$  and  $H_{obs}$  confirmed the absence of important bottleneck during the annual population dynamics. According to the absence of significant season and organ effects in the AMOVA, we pooled the individuals sampled at different dates within each site into a single population per site. Significant genotypic differentiation between these 17 site populations was detected ( $P < 3.7 \cdot 10^{-4}$ , with the Bonferroni correction) in 42 of the 136 pairwise comparisons, with  $F_{ST}^{ENA}$  values ranging from -0.003 to 0.083 (Table 4). Twenty-nine of these 42 significant pairwise differentiations concerned a population from the eastern area versus a population from the western area. No pairwise comparison was significant among populations within the western area or among populations within the southern area.

## Bayesian clustering

The three software programs, STRUCTURE, TESS and BAPS, used to assess the most probable number of genetically different populations, converged to the same result. Two clusters, referred to as A and B, were identified. The individual assignments with STRUCTURE, for two and three clusters, are presented in the Figure 3. The individual assignments for three clusters did not show sub-structure. The results of admixture in STRUCTURE for two clusters showed that individuals were highly assigned to a cluster. Seventy-one out of 848 individuals were assigned at less than 70% to a cluster. However, individuals of each cluster were present in different proportions at all the sites (Figure 4). Multiple comparisons for generalized linear models showed that individuals assigned to the cluster A were significantly ( $P < 0.016$ ) more present in the western area (mean frequency = 0.41) than in the eastern (mean frequency = 0.27) and the southern areas (mean frequency = 0.3). Furthermore, the genetic COA allowed graphical representation of the major axes of genetic differentiation within the sample using the clustering identified by STRUCTURE (Figure 5). The first two axes of the COA represented 100% of the entire genetic variation. Significant differences of the mean number of alleles per locus were observed between clusters. Individuals belonging to the cluster A had significantly ( $P < 0.01$ ) more alleles per locus ( $2.47 \pm 0.59$ ) than individuals belonging to the cluster B ( $1.89 \pm 0.34$ ).

The results of admixture in TESS showed a contrast between eastern populations, with more than 60% of the individuals belonging to cluster B and no individual belonging to cluster A, and western populations, with the individuals belonging to cluster A or B and numerous low assigned individuals (individual assignment to a cluster  $< 0.7$ ). The highest posterior probability with BAPS was obtained for a structure with two clusters, one that grouped the populations from the western and southern areas from MAR to DLP, except for HOU, and the second one that grouped the populations from the eastern area (SSU, TRE, ANS, TAK). Populations from MAR, HOU, CIL and BP had an absolute value of the logarithm of the marginal likelihood smaller than 6.7 (Online Resource 4), indicating that they could be assigned to one cluster or to another with only a small change in the likelihood (Kass & Raftery 1995). In contrast, the other populations were strongly affected to their respective cluster with absolute values greater than 11.1.

Chap. III - Table 3: Analyses of molecular variance (AMOVA) of the 27 populations of *P. mangiferae* sampled on Reunion Island. Genetic variation was broken down according to different factors (number of levels per factor in brackets). The asterisks indicate the significance of fixation index.

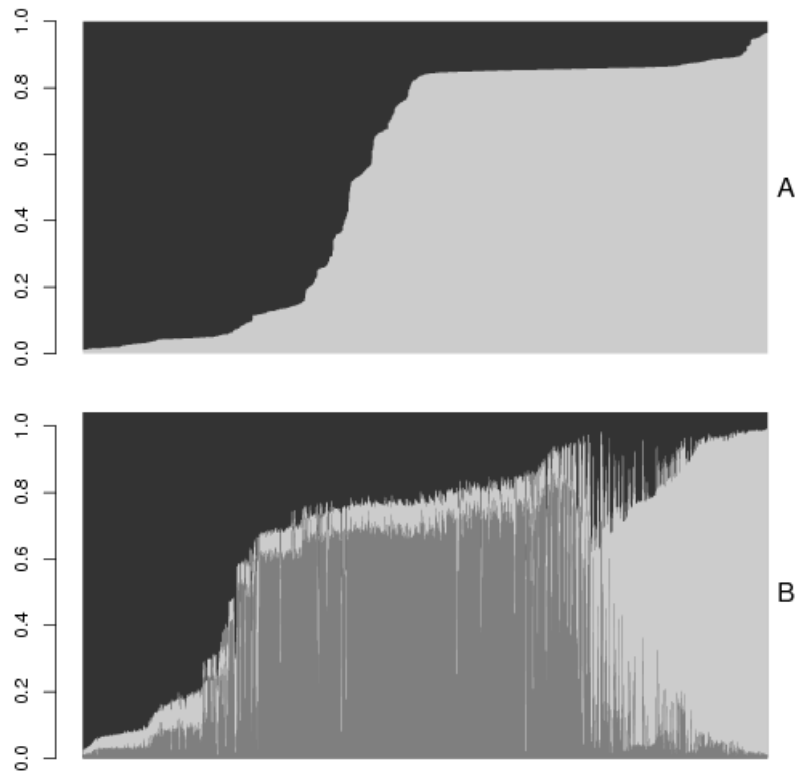
Group	Populations		<i>df</i>	SS	Percentage of variation	Variance components	Fixation Indices	
Area (3)	all (27)	Among groups	2	2.71	0.26	0.0013	FCT	0.0026*
		Among populations within groups	24	17.46	0.83	0.0040	FSC	0.0084*
		Within populations	1669	793.42	98.90	0.4754	FST	0.0197*
Cultivar (3)	all (27)	Among groups	2	1.95	0.08	0.0004	FCT	0.0008
		Among populations within groups	24	18.21	0.94	0.0045	FSC	0.0094*
		Within populations	1669	793.42	98.98	0.4754	FST	0.0102*
Season (2)	CPEA, LYC, SSU	Among groups	1	0.82	0.11	0.0005	FCT	0.0011
		Among populations within groups	8	5.45	0.65	0.0032	FSC	0.0066*
		Within populations	612	296	99.24	0.4837	FST	0.0076*
Organ (2)	CPEA, LYC, SSU	Among groups	1	0.67	-0.02	-0.0001	FCT	-0.0002
		Among populations within groups	8	5.60	0.72	0.0035	FSC	0.0072*
		Within populations	612	296	99.30	0.4837	FST	0.0070*



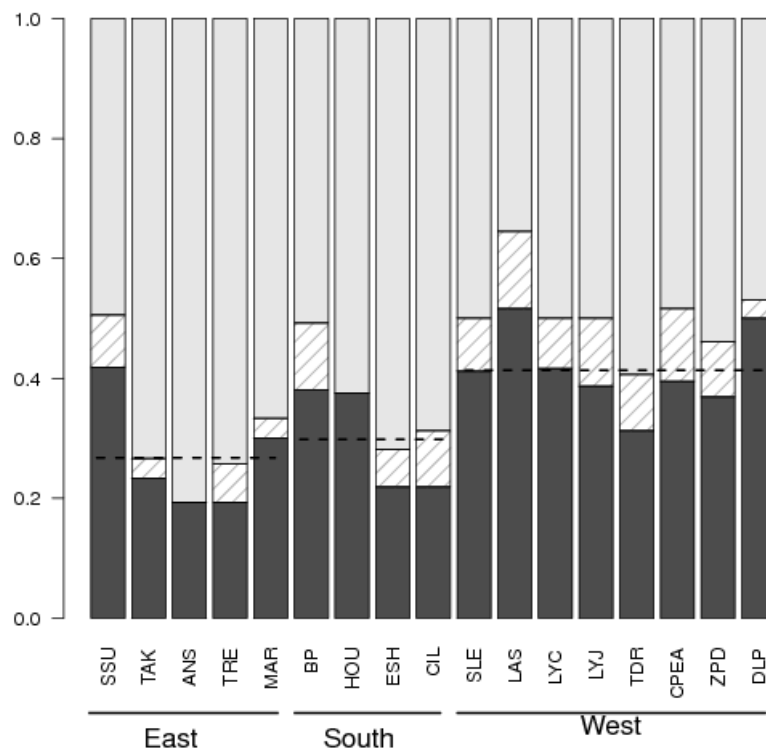
Chap. III - Table 4: Genetic differentiation between sites where populations of *P. mangiferae* were sampled.

<i>Area</i>	<i>East</i>									<i>South</i>				<i>West</i>							
Site	SSU	TAK		ANS	TRE		MAR		BP	HOU	ESH	CIL	SLE	LAS	LYC	LYJ	TDR	CPEA	ZPD		
<i>East</i>																					
TAK	0.033																				
ANS	0.031	*	0.046																		
TRE	0.031	0.028		0.006																	
MAR	0.050	***	0.044	0.025	0.060																
<i>South</i>																					
BP	0.032	***	0.025	0.034	***	0.024	0.054		**												
HOU	0.016	*	0.026	0.040	***	0.023	0.061	**	0.018												
ESH	0.014	0.045		0.064	0.052		0.083	0.016		0.020											
CIL	0.024	0.025		0.052	0.031		0.070	*	0.011	0.026	0.009										
<i>West</i>																					
SLE	0.011	0.061		0.041	***	0.059	0.044		**	0.040	0.030		0.021	0.037							
LAS	0.023	**	0.079	*	0.069	***	0.078	**	0.062	***	0.050	0.028		0.035	0.058	0.008					
LYC	0.031	***	0.067	***	0.058	***	0.078	***	0.046	***	0.040	*	0.049	**	0.028	0.045	0.002	0.020			
LYJ	0.004	0.037		0.041	***	0.039	***	0.045	***	0.025	0.006		0.012	0.021	0.004	0.005	0.021				
TDR	0.026	*	0.048	0.053		***	0.054	***	0.058	***	0.010	0.027		0.012	0.012	0.015	0.024	0.010	0.012		
CPEA	0.021	***	0.053	**	0.046	***	0.054	***	0.051	***	0.024	*	0.032	0.015	0.025	0.007	0.017	0.004	0.013	-0.003	
ZPD	0.007	0.045		0.023	***	0.037	***	0.029	***	0.021	***	0.017	0.015	0.025	-0.001	0.011	0.011	0.002	0.009	0.008	
DLP	0.023	0.041		0.039	***	0.054	0.032		***	0.014	0.030		0.015	0.028	0.009	0.020	0.002	0.012	-0.002	-0.002	0.005

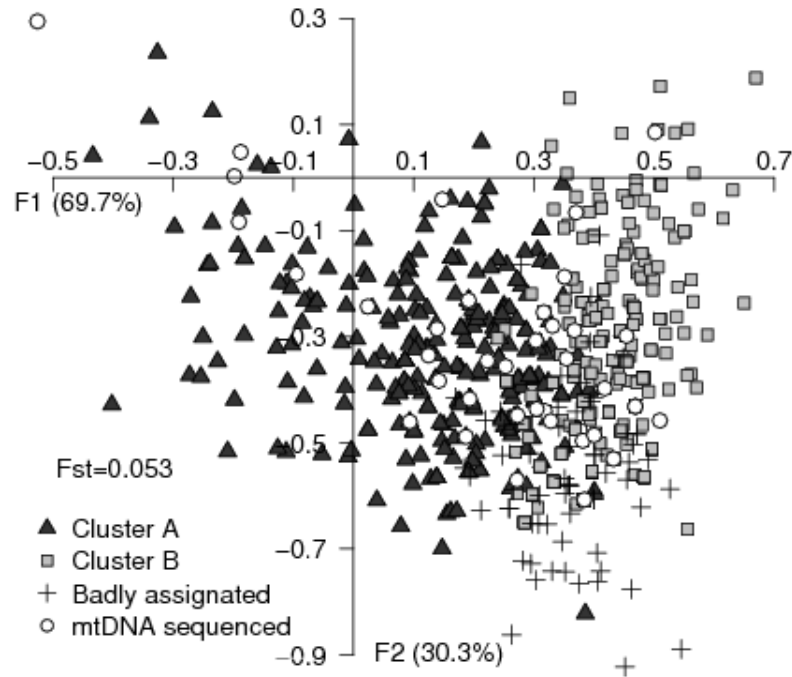
Values of pairwise estimators of  $F_{ST}$  (Weir 1996) with ENA correction, values are presented with their level of significance (Fisher's exact test for genotypic differentiation with the Bonferroni correction). Study-wise type 1 error level: \*  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 < P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .



Chap. III - Figure 3: Results of admixture analysis in STRUCTURE for K=2 clusters (A) and for K=3 clusters (B). Individuals are sorted by percentage of assignment.



Chap. III - Figure 4: Percentage of *P. mangiferae* individuals assigned by STRUCTURE at more than 70% to the cluster A (black) or to the cluster B (gray) at each site. Hatched areas correspond to hybrid individuals that were not assigned at more than 70% to a cluster. The horizontal dotted lines indicate the mean percentage of the cluster A in each area.



Chap. III - Figure 5: First factorial plane of the genetic correspondence analysis (AFC 3D per population on GENETIX). Individuals belonging to clusters A, B and low assigned individuals, as identified by STRUCTURE, are represented by different symbols; the individuals sequenced on mitochondrial DNA are indicated by an open circle.

### Discussion

Our study not only characterized the genetic diversity of the most damaging mango gall midge, *P. mangiferae*, but also gave insights into its ecology as an invader in a subtropical insular environment. This study was based on data from population dynamics surveys and from molecular analyses performed on individuals sampled in 17 sites in Reunion Island, on two mango organs and during two different seasons. Our results confirmed that a single species, *P. mangiferae*, was present all year round in different environments (climatic and cultural), and that it fed on both inflorescences and young leaves without any genetic difference. Populations were, however, structured into two clusters in sympatry and present in different proportions at each site.

No morphological differentiation was observed from a pool of individuals collected from both types of galled organs, young leaves and inflorescences. Furthermore, a phylogenetic analysis on mtDNA showed only one dominant haplotype all year round and throughout Reunion Island, regardless of the mango cultivar and galled organ. Finally, the low frequency of null alleles observed in the genetic analysis of the populations confirmed the presence of a single species (Chapuis & Estoup 2007; Malausa *et al.* 2007).

The one-year survey of gall midges in mango orchards confirmed that *P. mangiferae* can feed all year round on both inflorescences and young leaves, as reported by Prasad (1971) and Grover and Kashyap (1984). This result was not expected in Reunion Island since its presence was

only reported during the flowering season in previous studies (Vincenot & Normand 2009). In subtropical India, the native region of *P. mangiferae*, Prasad (1971) found that the entire populations entered into diapause at the end of the flowering period. Our results are the first record of permanently-active populations in a subtropical climate, thanks to the ability of this gall midge to feed on different organs of its host plant and to the ability of the mango tree to sporadically produce new inflorescences or leaves throughout the year. Consequently, *P. mangiferae* exhibits a large ecological plasticity since it feeds on different organs of a unique host plant and lives in contrasted climatic and cultural environments. Other gall midge species produce generations on a continuous basis, especially in warm and wet regions of the neotropics, but generally on herbaceous or bush host plants that grow all year round (Gagné 1994). Another strategy to maintain permanent populations is host shift, as reported by Freeman and Geoghagen (1989) with *Asphondylia boerhaaviae* Mohn. This gall midge produces about 17 generations per year on three plant species belonging to the Nyctaginaceae family in Jamaica.

Despite its permanent presence, populations of *P. mangiferae* showed considerable variations in size, from large numbers of individuals during mango flowering in winter to barely detectable numbers of individuals during mango vegetative growth in summer. The large variation in population size is a factor that reduces genetic diversity (Nei *et al.* 1975). However, genetic analyses did not support the presence of a bottleneck for the populations sampled at different sites and months. The genetic diversity of *P. mangiferae* was thus maintained throughout the year. Such a lack of a genetic bottleneck despite a drastic reduction of the effective population size during adverse conditions has already been reported for *Anopheles arabiensis* Patton (Diptera: Culicidae) (Kent *et al.* 2007) and *A. funestus* Giles (Michel *et al.* 2006). These authors assumed that this was due to the small number of generations produced during the adverse season, but with a large effective population size on a large spatial scale, plus migration. These processes are probably not involved in the maintenance of the genetic diversity of *P. mangiferae* due to its short life-span and probably a low migration capacity (Kolesik 2000). In our case, a first hypothesis could be that a proportion of the *P. mangiferae* populations enter into diapause at each generation. Backcrosses would then occur during the summer generations between gall midges that emerge after diapause and individuals in the process of fulfilling their normal short life cycle. A second hypothesis could be that the resources offered by young mango leaves support sufficient populations to maintain a high level of genetic diversity in spite of low individual density.

Pairwise estimators of  $F_{st}$ , AMOVA and clustering analyses conducted with three different Bayesian analyses showed the presence of two clusters in the populations of *P. mangiferae* at the Reunion Island sites. These two clusters were separated in the first factorial plane of a COA, an independent type of analysis that makes no assumption regarding Hardy–Weinberg and linkage equilibrium (Delatte *et al.* 2006). Individuals belonging to each cluster were scattered at most of the sample sites, with well-balanced frequencies of the two clusters in the western area. Six hypotheses are proposed to explain the presence of the two clusters in sympatry at each site, and are discussed. First, clustering may be due to the specialization of individuals on one mango organ. Our results showed that populations feeding on different mango organs were not differentiated by

mitochondrial or nuclear DNA. Moreover, individuals feeding on inflorescences and leaves were distributed in the two clusters. In the second hypothesis, individuals with continuous development may be different from diapausing individuals. However, we verified, on 144 adults from six populations (four from CPEA, one from LYC and one from LYJ), that the pairwise estimator of  $F_{st}$  was not significant ( $F_{st} = -0.003$ ;  $P > 0.05$ ; data not shown) and that the allelic richness was well balanced between adults emerging without diapause and after diapause. In the third hypothesis, the gene flow between the two clusters might be limited by post-zygotic barriers such as secondary endosymbionts (Zimmer 2001). The fourth hypothesis invokes the geographic and climatic conditions of Reunion Island, and the fifth hypothesis is related to the availability of resources, which is a factor that could promote population structuring, as was shown for the Hessian fly (*Mayetiola destructor*) (Morton *et al.* 2011). However, the higher frequency of cluster A in the western area cannot be explained by climatic, geographic or cultural practices alone because of the close relationship between these three factors. The western area is subjected to dry conditions and corresponds to the most suitable area for mango production. About 70% of mango orchards are planted in this area (Vincenot & Normand 2009). In contrast, the eastern area is the most humid, unsuitable for economically-viable mango production. Last hypothesis, agriculture is known to facilitate invasions by offering large resources, by creating disturbed sites for colonization and by inducing population structure (Sakai *et al.* 2001). In agro-ecosystems, pests are exposed to the selection pressure of agricultural practices, inducing traits for persistence and noxiousness (Sakai *et al.* 2001). The selection pressures on insects could be due to insecticide treatments or environmental perturbations, and they rapidly induce a genetic structure (Brévault *et al.* 2011; Endersby *et al.* 2006; Franck *et al.* 2007; White & Czajkowska 2009). The high density of resources and agricultural practices could have induced selection pressures in the mango production area that allowed diversification after the occurrence of a bottleneck at the moment of its introduction on the island. The first mention of this pest was done in 1974 in the western coast where we observed the highest genetic diversity. The abundant mango resources in this area may support large population size that favours the maintaining of its genetic diversity. Despite a higher diversity in the mango production area, the entire genetic diversity of this species in Reunion Island remains low. We probably observed the beginning of population structuring for this recently introduced pest species.

As defined by Davis (2009), the successful establishment of invasive populations requires the accomplishment of four tasks by the immigrant individuals: (i) finding an environment with abiotic conditions they can tolerate; (ii) having access to resources necessary for their maintenance, growth and reproduction; (iii) finding a mate; and (iv) avoiding pre-reproductive mortality. Our results showed that *P. mangiferae* has the assets that allow it to fulfill the two first tasks. First, the ecological plasticity of mango blossom gall midge suggests that it could encounter environments with favorable abiotic conditions. Second, regardless of the phenological season of mango in the invaded country, it could be capable of accessing the resources necessary for its reproduction since larvae are able to feed on mango inflorescences as well as on young leaves. Moreover, introduced organisms experience ‘founder effects’, including genetic bottlenecks that result in significant reductions in genetic diversity (Ahern *et al.* 2009). The fact that *P. mangiferae* is able to feed on

different organs despite a low genetic diversity is proof of the phenotypic plasticity of this species. It contributes to the ability of this gall midge to establish itself at new sites and to be invasive (Agrawal 2001). Furthermore, concerning persistence and spread, *P. mangiferae* has other adaptive advantages, including 'r-selected' traits (Davis, 2009) such as a high rate of reproduction (each female can lay up to 150 viable eggs (Prasad 1971) and a short generation time. Our results showed that *P. mangiferae* therefore has numerous characteristics that define a good invader and could explain its distribution in mango areas worldwide.

### **Conclusion**

This study showed that despite its low genetic diversity, the invasive pest, *P. mangiferae*, exhibited a large ecological and phenotypic plasticity by adapting to different ecological conditions (cultivated vs. wild trees, dry vs. humid areas, winter vs. summer) and by feeding on different organs of a unique host plant. It was also shown that despite low population size in summer, there was no loss of genetic diversity throughout the year. Populations were found to be structured according to their geographic localization, agricultural practices, climatic conditions or secondary endosymbiont presence. The low genetic diversity suggested a recent introduction on Reunion Island. The ecological plasticity and the ability of this species to generate permanent populations, with a part of diapausing individuals that preserve the genetic diversity in case of adverse conditions, are factors favoring its establishment in new areas and contributing to its invasive success worldwide.

### **Acknowledgements**

We are especially grateful to B. Facon and V. Ravigné for their helpful comments and discussions. We are also grateful to E. Pierre of the Center for Biology and Management of Populations (CBGP) for the morphological identification of *P. mangiferae* and for his enlightening discussion on Cecidomyiidae. We thank an anonymous reviewer and the editor for their critical reading and suggestions. We would also like to thank L. Maillary for his helpful assistance during sampling and C. Simiand for his technical assistance in the laboratory. This work was funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD, Bilan de Santé de la PAC, No 11111D974000019) and by CIRAD.



*Supplementary data*



(A)



(B)

**Online Resource 1** Photographs of galls of *P. mangiferae* on young mango leaves (A) and elongating inflorescences (B).

## Online Resource 2 Characterization of microsatellite loci isolated from *P. mangiferae*

(Amouroux et al., 2012).

Locus-Genbank accession number	Repeat motif	Primer sequences	Size of cloned fragment	Allele size range (bp)	Tm (°C)
PmCIRB12 - JF746887	(ct)22	F: AGGGAATTTGGAGTGGAC R: GATCATCCCGCAGACTTT	231	231-239	55.4
PmCIRB10 - JF746880	(ct)10	F: CCGCTGTTCTATGTACCG R: GAACAAAAGACGCAATCG	144	140-144	55.2
PmCIRB6 - JF746882	(ct)10	F: CCTTCGTTACAGCTCAC R: AAAGCGGGAGATAGAGGA	155	157-159	55.0
PmCIRC12 - JF746885	(tc)20	F: TCGAACTTCATCCGTTTC R: CCCATGCAGCTACTTTCA	211	201-257	55.1
PmCIRC62 - JF746888	(ac)7	F: GCCGATTATTTTCATGTGC R: ACCAAAAGATACAACATCACAA	233	229-235	54.9
PmCIRD12 - JF746884	(ag)16	F: TGGAGCGTTTGTGATTTT R: ATCAATGGTGCGAATTTT	198	192-202	54.5
PmCIRD8 - JF746879	(gt)9	F: ACATAACGATGTTTTACGACAG R: CCTGGCATTTTATGCACT	127	129-137	54.6
PmCIRE11 - JF746886	(tc)8	F: TTGCATTTTACTTGCGAAT R: ACTTGATGCATCATAACCG	233	227-233	54.5
PmCIRE12 - JF746889	(gt)7	F: TCAAACGAAGCCATTGAT R: AGATGATGAGAGCGAAGC	255	251-253	54.4
PmCIRE5 - JF746881	(gt)10	F: ACTCCACACTAGCGACCA R: TGCATGAAATCAACCTAATG	144	132-142	54.8
PmCIRF5 - JF746883	(ag)18	F: TTCAATACTTCCATCGTATCAA R: AGAGGACGAAATGGGGTA	183	181-185	55.2

**Online Resource 3:** Tree of aligned sequences of the COI mitochondrial gene of four *Procontarinia* species, obtained by Bayesian analysis. For *P. mangiferae*, the population code (See Table 1) is indicated after the species name.



**Online Resource 4:** Structure of 17 *P. mangiferae* populations on Reunion Island analyzed with BAPS, based on 100 simulations for K=2 clusters. The values are the change in the logarithm of marginal likelihood (LML) for a population of cluster *i* to be moved to cluster *j* (*i* column), or for a population of cluster *j* to be moved to cluster *i* (*j* column). When  $-3.2 < \text{LML}$ , the assignation of the population to a cluster is not significant; when  $-10 < \text{LML} < -3.2$ , the assignation of the population to a cluster is substantial; when  $\text{LML} < -10$ , the assignation of the population to a cluster is strong (Kass and Raftery 1995).

<b>Cluster</b>	<b>i</b>	<b>j</b>
<b>SSU</b>		-24.7
<b>TRE</b>		-19.5
<b>ANS</b>		-18.8
<b>TAK</b>		-11.1
<b>HOU</b>		-3.8
<b>CIL</b>	-4	
<b>MAR</b>	-5.9	
<b>BP</b>	-6.7	
<b>ESH</b>	-11.1	
<b>LYJ</b>	-13.6	
<b>TDR</b>	-24.2	
<b>DLP</b>	-25.2	
<b>SLE</b>	-27.3	
<b>LAS</b>	-28	
<b>ZPD</b>	-32.5	
<b>CPEA</b>	-64.3	
<b>LYC</b>	-65.7	

### III.3. Conclusion du chapitre

L'étude de la diversité et de la structure des populations de cécidomyies des fleurs à la Réunion nous a permis de démontrer qu'une seule espèce, *Procontarinia mangiferae*, était présente à la Réunion sur toute l'île, tout au long de l'année et à la fois sur les inflorescences et les organes végétatifs du manguier.

Ces résultats ouvrent la voie à l'étude de la biologie et de l'écologie de cette espèce. Il s'agit, en conséquent, d'étudier non seulement les populations hivernales (génératrices de dégâts économiques dans les vergers) mais aussi les populations estivales pour évaluer leur rôle et leur importance dans la survie de l'espèce.

Par ailleurs, les marqueurs développés peuvent être utile pour étudier la diversité génétique mondiale de cette espèce et retracer ses routes d'invasion.

## Références bibliographiques

- Agrawal AA (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* **294**, 321-326.
- Ahern R, Hawthorne D, Raupp M (2009) Founder effects and phenotypic variation in *Adelges cooleyi*, an insect pest introduced to the eastern United States. *Biological Invasions* **11**, 959-971.
- Amouroux P, Normand F (2010) Survey of mango pests on Réunion Island, with a focus on pests affecting flowering. In: *9th International Mango Symposium*, p. 24, Sanya, China.
- Amouroux P, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2012) Isolation and characterization of microsatellite markers from *Procontarinia mangiferae* (Felt). Original manuscript. In: *Molecular Ecology Resources*, pp. 185-189.
- Amouroux P, Normand F, Vincenot D (2009) Le raisonnement de la conduite du verger. In: *Guide de Production Intégrée de mangues à la Réunion*.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations. *Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France*.
- Blair CP, Abrahamson WG, Jackman JA, Tyrrell L (2005) Cryptic speciation and host-race formation in a purportedly generalist tumbling flower beetle. *Evolution* **59**, 304-316.
- Bompard JM (2009) Taxonomy and systematics. In: *The Mango: botany, production and uses* (ed. Litz RE), pp. 19-41. CAB International, Wallington, UK.
- Boubou A, Migeon A, Roderick G, Navajas M (2011) Recent emergence and worldwide spread of the red tomato spider mite, *Tetranychus evansi*: genetic variation and multiple cryptic invasions. *Biological Invasions* **13**, 81-92.
- Bretz F, Hothorn T, Westfall P (2011) *Multiple comparisons using R* CRC Press, Boca Raton, USA.
- Brévault T, Carletto J, Tribot J, Vanlerberghe-Masutti F (2011) Insecticide use and competition shape the genetic diversity of the aphid *Aphis gossypii* in a cotton-growing landscape. *Bulletin of Entomological Research* **101**, 407-413.
- CAB I (2004) Crop Protection Compendium. In: *2004*. CAB International, Wallingford, UK.
- Carletto J, Lombaert E, Chavigny P, *et al.* (2009) Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Molecular Ecology* **18**, 2198-2212.
- Castillo RFd (1994) Factors influencing the genetic structure of *Phacelia dubia*, a species with a seed bank and large fluctuations in population size. *Heredity* **72**, 446-458.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Chen C, Durand E, Forbes F, François O (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes* **7**, 747-756.
- Cook MA, Ozeroff SN, Fitzpatrick SM, Roitberg BD (2011) Host-associated differentiation in reproductive behaviour of cecidomyiid midges on cranberry and blueberry. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **141**, 8-14.
- Corander J, Siren J, Arjas E (2008) Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics* **23**, 111-129.



- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Davis MA (2009) *Invasion biology* Oxford University Press, New York, USA.
- Delatte H, David P, Granier M, *et al.* (2006) Microsatellites reveal extensive geographical, ecological and genetic contacts between invasive and indigenous whitefly biotypes in an insular environment. *Genetical Research* **87**, 109-124.
- Delatte H, Reynaud B, Granier M, *et al.* (2005) A new silverleaf-inducing biotype Ms of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous to the islands of the south-west Indian Ocean. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 29-35.
- Dereeper A, Argout X, Billot C, Rami JF, Ruiz M (2007) SAT, a flexible and optimized Web application for SSR marker development. *BMC Bioinformatics* **8**, 465.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history evolution despite genetic bottlenecks. *Ecology Letters* **11**, 701-709.
- Dorchin N (2008) Cecidomyiidae (Diptera). In: *Encyclopedia of Entomology* (ed. Capinera JL), pp. 1576-1580. Springer Science, Dordrecht, The Netherlands.
- Durand E, Chen C, François O (2009) TESS version 2.3 - Reference Manual, p. 30.
- Endersby NM, McKechnie SW, Ridland PM, Weeks AR (2006) Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Molecular Ecology* **15**, 107-118.
- Etienne J (1977) Notes sur les cécidomyies du manguier à la Réunion (ed. I.R.A.T.). I.R.A.T., Ile de la Réunion, France.
- Etienne J, Roura A (1974) Note sur l'entomofaune des manguiers à la Réunion. In: *Rapport I.R.A.T.* (ed. I.R.A.T.), pp. 89-92, Ile de la Réunion, France.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.
- Facon B, Genton BJ, Shykoff J, *et al.* (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution* **21**, 130-135.
- Felt EP (1911) A generic synopsis of the Itonidae. *Journal of the New York Entomological Society*, 31-62.
- Felt EP (1918) A study of gall midges, VI. Family Itonididae. Tribe Itonididinae. In: *33rd Report of the State Entomologist on injurious and other insects of the State of New York 1917*, pp. 76-205. New York State Museum Bulletin.
- Franck P, Reyes M, Olivares J, Sauphanor B (2007) Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Molecular Ecology* **16**, 3554-3564.
- Freeman BE, Geoghagen A (1989) A population study in Jamaica on the gall-midge *Asphondylia boerhaaviae*: A contribution to spatial dynamics. *Journal of Animal Ecology* **58**, 367-382.
- Funk DJ, Futuyma DJ, Orti G, Meyer A (1995) Mitochondrial DNA Sequences and Multiple Data Sets: A Phylogenetic Study of Phytophagous Beetles (Chrysomelidae: Ophraella ). *Molecular and Biology Evolution* **12**, 627-640.

- Gagné RJ (1989) Family Cecidomyiidae. In: *Catalog of the Diptera of Australasia and Oceania* (ed. Evenhuis NL), pp. 152-163. HI: Bishop Museum & E. J. Brill., Honolulu, USA.
- Gagné RJ (1994) *The gall midges of neotropical region* Cornell University Press, New York, USA.
- Gagné RJ (2004) *A catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world* Entomological Society of Washington, Washington, USA.
- Gagné RJ (2010) Update for a catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Digital version 1.
- Gagné RJ, Medina CD (2004) A new species of *Procontarinia* (Diptera : Cecidomyiidae), an important new pest of mango in the Philippines. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **106**, 19-25.
- Goudet J (1995) FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). p. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Grover P, Kashyap V (1984) On the study of bio-ecology of certain gall-midges (Cecidomyiidae, Diptera) - A discussion. *Cecidologia indica* **V**, 73-127.
- Hugon R (1979) The complex of gall-forming organisms and cecidomyids of mango in the Island of Réunion, Congress on the control of insects in the tropical environment, 13 au 16 mars 1979, Marseille, France, 413-422.
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.
- Jones RG, Gagné RJ, Barr WF (1983) Biology and taxonomy of the *Rhopalomyia* gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) of *Artemisia tridentata* Nuttall (Compositae) in Idaho. *Contributions of the American Entomological Institute* **21**, 1-79.
- Joy JB, Crespi BJ (2007) Adaptive radiation of gall-inducing insects within a single host-plant species. *Evolution* **61**, 784-795.
- Kass RE, Raftery AE (1995) Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association* **90**, 773-795.
- Kent RJ, Mharakurwa S, Norris DE (2007) Spatial and temporal genetic structure of *Anopheles arabiensis* in Southern Zambia over consecutive wet and drought years. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **77**, 316-323.
- Kolbe JJ, Glor RE, Rodriguez Schettino L, *et al.* (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature* **431**, 177-181.
- Kolesik P (2000) Distribution of infestation by lentil gall midge *Contarinia lentis* (Dipt., Cecidomyiidae) in lentil fields: statistical model. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* **124**, 7-10.
- Kolesik P, Rice AD, Bellis GA, Wirthensohn MG (2009) *Procontarinia pustulata*, a new gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae) feeding on mango, *Mangifera indica* (Anacardiaceae), in northern Australia and Papua New Guinea. *Australian Journal of Entomology* **48**, 310-316.

- Launey S, Brunet G, Guyomard R, Davaine P (2010) Role of Introduction History and Landscape in the Range Expansion of Brown Trout (*Salmo trutta* L.) in the Kerguelen Islands. *Journal of Heredity* **101**, 270-283.
- Le Bellec F, Renard V (1997) *Le grand livre des fruits tropicaux* Editions Orphie, Saint-Denis, Ile de la Réunion, France.
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* **17**, 386-391.
- Malausa T, Dalecky A, Ponsard S, *et al.* (2007) Genetic structure and gene flow in French populations of two *Ostrinia* taxa: host races or sibling species? *Molecular Ecology* **16**, 4210-4222.
- Michel A, Grushko O, Guelbeogo W, *et al.* (2006) Effective population size of *Anopheles funestus* chromosomal forms in Burkina Faso. *Malaria Journal* **5**, 115.
- Morton PK, Foley CJ, Schemerhorn BJ (2011) Population structure and spatial influence of agricultural variables on hessian fly populations in the Southeastern United States. *Environmental Entomology* **40**, 1303-1316.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics* Columbia University Press, New york, USA.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty D (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* **29**, 1-10.
- Peccoud J, Figueroa CC, Silva AX, *et al.* (2008) Host range expansion of an introduced insect pest through multiple colonizations of specialized clones. *Molecular Ecology* **17**, 4608-4618.
- Peña JE, Mohyuddin AI, Wysoki M (1998) A review of the pest management situation in mango agroecosystems. *Phytoparasitica* **26**, 129-148.
- Perdereau E, Dedeine F, Christidès JP, Dupont S, Bagnères AG (2011) Competition between invasive and indigenous species: an insular case study of subterranean termites. *Biological Invasions* **13**, 1457-1470.
- Pezhman H, Askari M (2004) A study on the biology of mango inflorescence midge in Hormozgan province. *Applied Entomology and Phytopathology* **72**, 19-29.
- Phillips BL, Brown GP, Webb JK, Shine R (2006) Invasion and the evolution of speed in toads. *Nature* **439**, 803-803.
- Pierre E (2011) Les diptères nématocères : la préparation microscopique. [http://ephytia.inra.fr/caracterisation/caracterisation\\_utilisateur/index\\_appli.php?portail=bioagresseurs&produit=caracterisation&main=56&ssrub1=36&ssrub2=37](http://ephytia.inra.fr/caracterisation/caracterisation_utilisateur/index_appli.php?portail=bioagresseurs&produit=caracterisation&main=56&ssrub1=36&ssrub2=37) Accédé le 13/01/2012
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* **14**, 817-818.
- Prasad SN (1971) *The Mango Midge Pests* Cecidological Society of India, Allahabad, India.
- Prasad SN, Grover P (1974) Population fluctuation of *Erosomyia indica* Grover. *Cecidologia indica* **IX**, 1-38.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 954-959.
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. In: *R foundation for statistical computing*. ISBN 3-900051-07-0. Website <http://www.R-project.org/>, Vienna, Austria.

- Raman A (2012) Adaptive radiation and diversification in gall-inducing insects in the Indian subcontinent: search for a pattern. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* **59**, 177-187.
- Raman A, Burckhardt D, Harris KM (2009) Biology and adaptive radiation in the gall-inducing Cecidomyiidae (Insecta Diptera) and Calophyidae (Insecta Hemiptera) on *Mangifera indica* (Anacardiaceae) in the Indian subcontinent. *Tropical Zoology* **22**, 27-56.
- Raunet M (1991) *Le milieu physique et les sols de l'île de la Réunion, conséquences pour la mise en valeur agricole*. CIRAD, Saint-Denis, Ile de la Réunion, France.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **12**, 1572-1574.
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.
- Rousset F (2008) GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Stireman JO, Janson EM, Carr TG, Devlin H, Abbot P (2008) Evolutionary radiation of *Asteromyia carbonifera* (Diptera: Cecidomyiidae) gall morphotypes on the goldenrod *Solidago altissima* (Asteraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **95**, 840-858.
- Stuart JJ, Chen MS, Harris MO (2008) Hessian Fly. In: *Genome Mapping and Genomics in Arthropods*, pp. 93-102. Springer Berlin Heidelberg.
- Suarez AV, Tsutsui ND (2008) The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology* **17**, 351-360.
- Sun XJ, Xiao JH, Cook JM, Feng G, Huang DW (2011) Comparisons of host mitochondrial, nuclear and endosymbiont bacterial genes reveal cryptic fig wasp species and the effects of *Wolbachia* on host mtDNA evolution and diversity. *Bmc Evolutionary Biology* **11**.
- Swofford DL (1998) PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony, version 3.1.1. *Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey. Champaign, IL, USA*.
- Tabashnik BE (1983) Host range evolution: the shift from native legume hosts to alfalfa by the butterfly, *Colias philodice eriphyle*. *Evolution* **37**, 150-162.
- Tagu D, Moussard C (2005) *Principes des techniques de biologie moléculaire*, 2nd Edition, revue et augmentée edn. INRA Editions, 176pp.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. . *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
- Uechi N, Yukawa J (2006) Life History Patterns and Host Ranges of the Genus *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae). In: *Galling Arthropods and Their Associates*, pp. 275-285. Springer, Tokyo, Japan.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Vincenot D, Normand F (2009) *Guide de production intégrée de mangues à la Réunion* CIRAD et Chambre d'Agriculture, Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France. 121pp.

- Ward NL, Masters GJ (2007) Linking climate change and species invasion: an illustration using insect herbivores. *Global Change Biology* **13**, 1605-1615.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 376pp.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1570.
- White PF, Czajkowska M (2009) Effects of Methoprene and Permethrin on paedogenetic larvae of *Heteropeza pygmaea* and *Mycophila speyeri* (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Economic Entomology* **93**, 1222-1226.
- Whitwell AC (1993) The pest/predator/parasitoid complex on mango inflorescence in Dominica. *Acta Horticulturae* **341**, 421-432.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.
- Yukawa J (2000) Synchronization of gallers with host plant phenology. *Population Ecology* **42**, 105-113.
- Yukawa J, Uechi N, Horikiri M, Tuda M (2003) Description of the soybean pod gall midge, *Asphondylia yushimai* sp. n. (Diptera: Cecidomyiidae), a major pest of soybean and findings of host alternation. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 73-86.
- Zimmer C (2001) Wolbachia: A Tale of Sex and Survival. *Science* **292**, 1093-1095.

### IV.1. Présentation

Le deuxième objectif de la thèse est d'étudier la diapause de *P. mangiferae* à l'île de la Réunion.

Les arrêts de développement tels que la diapause et la quiescence sont des traits de vie essentiels à la survie d'une espèce. Ils offrent aux insectes la possibilité d'utiliser seulement une partie de l'année pour se reproduire en synchronisant leur présence à celle de la ressource. Ils permettent d'autre part d'éviter une période défavorable comme l'hiver en milieu tempéré. En zone tropicale, la diapause est également largement répandue (Denlinger 1986).

Précédemment, nous avons observé que *P. mangiferae* était présente toute l'année sur l'île de la Réunion en alternance sur les inflorescences et les feuilles (unités de croissance végétatives) du manguiers. En Inde sous un climat subtropical, l'ensemble des individus de *P. mangiferae* entre en diapause à la fin de la saison de floraison (mois de mai) (Prasad 1971).

Les objectifs de cette partie sont de mettre en évidence l'existence de la diapause en conditions naturelles et de décrire ses principales caractéristiques chez les populations de *P. mangiferae* de l'île de la Réunion

Cette étude répond à trois questions :

*P. mangiferae* diapause-t-elle à la Réunion ?

Comment le taux d'entrée en diapause varie-t-il au cours de l'année ?

Quelles sont les principales caractéristiques (durée, facteurs contrôlant la sortie) de cette diapause ?

Pour répondre à ces questions, des expérimentations en verger et en milieu contrôlé ont été mises en place. Des pièges à émergence installés de manière permanente sous des manguiers ont permis de suivre les émergences des individus en diapause dans le sol en conditions naturelles. Des échantillonnages mensuels de larves s'éjectant des inflorescences ou des jeunes feuilles ont permis de quantifier le taux d'entrée en diapause pendant les mois d'été et d'hiver.

Les effets de la température, de la photopériode et du type de ressource sur l'induction de la diapause ont été testés en chambre climatique sur des manguiers maintenus en pot. Quatre conditions ont été testées simultanément en croisant une température constante de  $29\pm 1^\circ\text{C}$  ou  $20\pm 1^\circ\text{C}$  avec une photopériode de 13:11 ou 11:13 (jour:nuit). Chaque condition contenait quatre manguiers en floraison et deux manguiers en croissance végétative. Quatre à six répétitions par condition ont été effectuées à partir d'adultes prélevés en juillet et en septembre. Aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir de taux de diapause supérieur

à quelques pour mille alors que ces conditions correspondent en milieu naturel à des taux d'induction variant entre 5 et 25%. Parmi les hypothèses qui pourraient expliquer cette absence d'induction, nous pouvons mentionner (i) l'absence d'alternance des températures en jour et nuit qui pourrait réduire l'induction de diapause comme chez les papillons monarques (Goehring and Oberhauser 2002) ; (ii) l'absence, dans les jeunes manguiers en pot, d'un élément biochimique inducteur de la diapause, de la même manière que le jeune âge des plants de mil diminue l'induction de diapause des larves de *Coniesta ignefusalis* (Hampson) (Lepidoptera: Pyralidae) (Tanzubil et al. 2000).

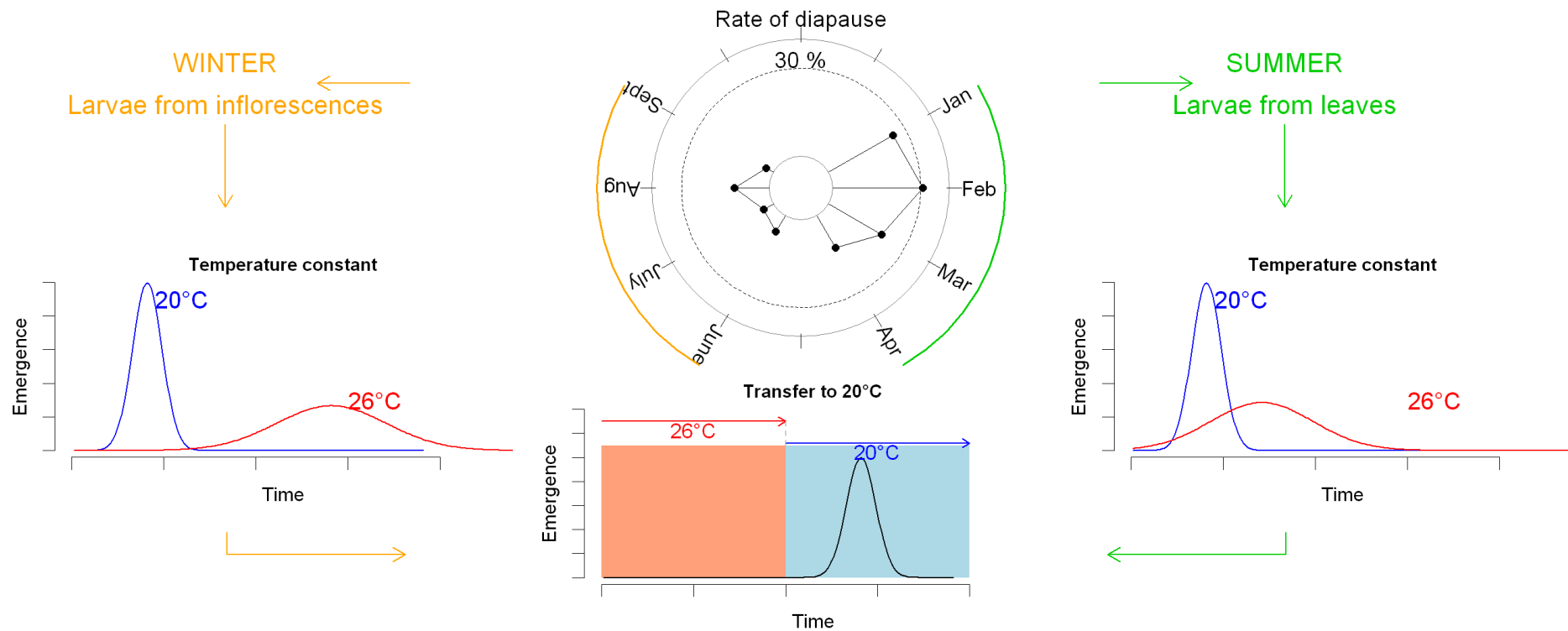
En milieu contrôlé, l'effet de la température sur la durée de la diapause a été testé sur des larves collectées durant l'hiver (juin à septembre) et l'été (janvier à avril). Un premier essai a testé l'effet d'un régime de températures constantes (20° et 26°C) et un deuxième essai l'effet d'une température de 26°C suivie d'une baisse à 20°C.

Les analyses ont montré que la diapause était induite toute l'année avec un taux d'induction significativement plus élevé en été (jusqu'à 30%) qu'en hiver (moins de 10%) (Figure 0). La saisonnalité de la phénologie du manguier n'a pas permis en conditions naturelles de séparer l'effet lié aux conditions abiotiques (température et photopériode) de celui lié au type de ressource (inflorescence vs. jeunes feuilles). En milieu naturel, une durée de diapause supérieure à un an a été observée. Les émergences de diapause ont eu lieu tout au long de l'hiver tant que les températures hebdomadaires moyennes étaient inférieures à 22,0°C. En milieu contrôlé, nous avons montré que la durée de la diapause était plus longue à 26°C qu'à 20°C. Les premières émergences à ces températures constantes ont eu lieu après 6 semaines. De plus, à partir de 6 semaines de stockage à 26°C, une baisse de température à 20°C a déclenché une vague d'émergence 2 à 3 semaines après ce changement de température.

Cette diapause facultative et la capacité de se reproduire soit sur les inflorescences soit sur les jeunes feuilles permettent la présence continue de populations. Elle apparaît parfaitement adaptée au climat et à la phénologie du manguier à la Réunion. Les températures fraîches (20°C) de l'hiver permettent la synchronisation des émergences de diapause avec la période de floraison de manguier. De plus, la diapause prolongée est un mécanisme permettant de s'adapter à des événements imprévisibles (cyclones) et à une disponibilité variable de la ressource (alternance de floraison des manguiers).

Ce manuscrit sera soumis à *Journal of Insect Physiology*.





Chap. IV – Figure 0 : Résumé graphique : le graphique au centre en haut donne le taux de diapause des mois d'été pour des larves prélevées sous des jeunes feuilles (vert) et des mois d'hiver pour des larves prélevées sous des inflorescences (orange). Les graphiques à droite (larves issues de jeunes feuilles) et à gauche (larves issues d'inflorescences) présentent les dynamiques de sortie de diapause à des températures constantes de 20°C ou 26°C. Le graphique en bas au centre présente la dynamique de sortie de diapause après une baisse de température de 26°C à 20°C.

## ARTICLE C: Diapause of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) in Reunion Island

P. AMOUROUX<sup>1,2</sup>, F. NORMAND<sup>1</sup>, H. DELATTE<sup>3</sup>, S. NIBOUCHE<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> CIRAD, UPR HortSys, F-97455 Saint-Pierre, La Réunion, France

<sup>2</sup> Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France.

<sup>3</sup> CIRAD, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France.

<sup>4</sup> Corresponding author, e-mail: [samuel.nibouche@cirad.fr](mailto:samuel.nibouche@cirad.fr)

**Keywords:** facultative diapause, tropical gall midge, Cecidomyiidae.

### Abstract

The mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae*, is a multivoltine species inducing galls in inflorescences and leaves of the mango tree, *Mangifera indica*. In the subtropical Reunion Island, populations of *P. mangiferae* are observed all-year round, but the pattern and the role of dormancy in the life cycle has never been documented. In natural and controlled conditions, we demonstrated the occurrence of diapause all-year round. The duration of diapause was between 6 weeks to more than one year. The highest rate of diapause was 30% and corresponded to larvae collected in summer from mango leaves. This facultative diapause allows the permanent presence of *P. mangiferae* in the orchards. Under controlled conditions, we showed that high temperature (26°C) delayed the emergence, whereas cool temperature (20°C) shortened the diapause duration. A temperature decrease from 26°C to 20°C triggered off the emergence of diapausing individuals. The role of the facultative diapause life history of *P. mangiferae* was discussed regarding the climate of Reunion and the phenological cycle of mango trees.

## Introduction

Seasonality has resulted in species evolution toward strategies such as dormancy (escape in time) or migration (escape in space) that allow insects to get through the unfavorable season (Danks 2007). Diapause is widespread among tropical species (Denlinger 1986). Two dormancy strategies exist, quiescence which is an immediate developmental arrest in response to limiting environmental factors and diapause which is a developmental arrest scheduled in advance of the true developmental arrest (Danks 1987; Denlinger 2002). Diapause can be divided into three phases: pre-diapause, diapause and post-diapause (Kostal 2006). Firstly, the pre-diapause phase corresponds to the reception of signals announcing the seasonal changes by the susceptible stage of the insects. Diapause is induced by seasonal cues which are reliable signals for long-term prediction of environmental changes: photoperiod (Lehmann et al. 2012), temperature (Shintani et al. 2011), food quality (Liu et al. 2010) or a combination of signals (He et al. 2009). The pre-diapause phase usually finishes when insects have stored reserves and have found a sheltered location. Secondly, insects enter into the diapause phase *sensu stricto* during their responsive stage. A period of diapause maturation occurs during this phase and stops the insect development even when the conditions are favorable. Nevertheless, physiological changes occur during this phase in response to environmental stimuli and internal cues (Ragland et al. 2011). Environmental factors can modify the duration of this phase (Terao et al. 2012; Xiao et al. 2010). Thirdly, after the diapause maturation, insects are ready to continue their development as soon as the conditions become favorable (Jiang et al. 2010). During this post-diapause phase, insects are in a state similar to quiescence. Some insects can enter into prolonged diapause, which means that they stay in diapause during more than one year. Prolonged diapause can be regarded as an adaptation to pluriannual variability of resource availability (Hanski 1988). Diapause allows insects to survive during an unfavorable period of time, but also synchronizes reproduction and enables effective resource utilization (Danks 1987; Tauber et al. 1986). The synchronization with host plant phenology is a critical mechanism for phytophagous insects, because it determines the quality and the quantity of available food resources (Yukawa 2000).

Cecidomyiidae, commonly referred to as gall midges, is one of the largest families of nematoceros Diptera. The life cycle of Cecidomyiidae is closely associated with the phenology of their host plant, and gall midges have several adaptive synchronization strategies including diapause (Uechi and Yukawa 2006; Yukawa 2000). Synchronization has a critical meaning for cecidomyiid adults whose life span is mostly within one or few days (Yukawa 2000).

The mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (= *Erosomyia mangiferae* Felt) is a worldwide invasive monophagous mango pest. It is the only *Procontarinia* species able to

feed on different organs of the mango tree, inflorescences and young leaves (Raman 2012). The final instar larvae leave the mango organ, fall to the ground and bury themselves in the soil. Adult gall midges emerge from pupa in the soil and induce serious outbreaks during mango flowering (Prasad 1971; Vincenot and Normand 2009). The life cycle lasts between 14 to 25 days under natural conditions in Iran (Pezhman and Askari 2004). There is little available information on the diapause mechanisms developed by *P. mangiferae*. In tropical India, larvae enter into diapause at the end of the flowering period, but the biotic and/or abiotic conditions that induce diapause are unknown (Prasad and Grover 1974). In the subtropical Reunion Island, populations of *P. mangiferae* are observed all-year round (Amouroux et al. 2013) and the existence of dormancy (diapause and/or quiescence) in subtropical climate such as in Reunion island has never been documented.

In this study, we conducted experiments under natural and controlled conditions in Reunion (i) to demonstrate the occurrence of diapause and quantify its duration in natural conditions, (ii) to determine variations in the rate of diapause induction along the year in natural conditions, (iii) to determine the effects of temperature on diapause duration in controlled conditions. Diapause of *P. mangiferae* observed in Reunion Island was discussed regarding the mango tree phenology and the climate.

## Materials and methods

### *Dynamics of the adult emergence in natural conditions*

The objectives of this experiment were to investigate the existence of diapause and to determine its duration in natural conditions. It was conducted in a commercial orchard, cultivar Cogshall, located in the dry West coast of Reunion Island (Saint-Paul, Lycée agricole, 20° 58' S, 55° 18' E, 130 m a.s.l.). Air temperatures were recorded by an automatic weather station located 200 m from the orchard. Modified soil emergence traps designed by Kolesik et al. (2009) were used to record the emergence of adults from the soil (Supplementary data 1). Each trap was covered by a fine mesh textile fabric and isolated a 1m<sup>2</sup> soil area from the contamination by larvae falling from mango trees. Three sets of three emergence traps each were successively installed under nine trees to account for different patterns of soil contamination by larvae. The first set, hereafter referred to as set A, was installed on the 11<sup>th</sup> of July 2011, at the beginning of the flowering period. The traps were installed under mango trees bearing no inflorescences or young leaves, i.e. organs attacked by gall midges, since at least one month. This ensured that the soil under these traps did not contain recently fallen larvae and was assumed to contain only larvae in diapause, as non-diapausing larvae emerge within 8 days in outdoor conditions (Pezhman and Askari 2004). The second set, hereafter referred to as set B, was installed on the 11<sup>th</sup> of July 2011 under mango trees bearing inflorescences

in full bloom and recently damaged by *P. mangiferae*. The last set, hereafter referred to as set C, was installed on the 15<sup>th</sup> of September 2011, at the end of the flowering period, under mango trees bearing inflorescences recently damaged by *P. mangiferae*. The soil under the traps B and C was assumed to contain recently fallen larvae, at the beginning and at the end of the flowering period respectively, and, possibly, larvae in diapause from previous contaminations. Emerged adults were collected and counted weekly during 15 months, from July 2011 to September 2012, in a collecting bottle filled with water and placed at the top of each trap.

#### *Seasonal changes in diapause rate induced in natural conditions*

The objective of this experiment was to assess the rate of diapause during winter and summer. From June 2011 to June 2012, final instar larvae were collected at nine dates in a commercial mango orchard, cultivar José, located in the dry West coast of Reunion Island (Saint-Gilles, 21°02'33" S, 55°13'45"E, 65 m a.s.l.). Air temperatures were recorded by an automatic weather station located about 2 km from the orchard. Tarpaulins of about 1 m<sup>2</sup> were used as traps for larvae falling from mango organs at phenological stages susceptible to *P. mangiferae*, i.e. inflorescences or young leaves depending on the mango resources available in the orchard. Traps were placed at the end of the afternoon below one to eight trees. Larvae were collected early in the following morning. Each month, larvae were collected during one to four successive days in order to obtain sufficient number of larvae. Larvae collected a same day from different trees were pooled and transported to the laboratory.

In the laboratory, between 100 and 250 living larvae were placed in a 0.5 L plastic emergence box (mosquito breeder BioQuip®) filled with 150 g of sterile sand, sieved at 0.8 mm and humidified at 5% (wt/wt) with distilled water. Sand humidity was adjusted fortnightly by weighing the emergence boxes. The emergence boxes consisted of two clear plastic containers separated by an upside down funnel-shaped pipe (Supplementary data 2). On the top container, an air vent covered with wire mesh allowed ventilation. The sand and the *P. mangiferae* larvae were placed in the lower container. After emergence, the adults flew to the top container, where they were collected and counted. Experiments were conducted in environmental chambers (Luminincube II, Analis, Belgium; MLR-350, Sanyo, Japan) maintained at a constant temperature of 20±1°C and under a LD 12:12 photoperiod. These environmental chambers were also used for the two other laboratory studies (see below).

At 20°C, larvae of *P. mangiferae* complete their development in seven to eleven days (8.4±1.1 d) and no emergence was observed between 14 and 20 days (Supplementary data 3). Consequently, we assumed that larvae whose pupation lasted more than 21 days were in diapause. During the first three weeks, corresponding to non diapausing larvae, adult emergences were

recorded weekly. The number of larvae in diapause was evaluated by sieving the sand at 21 days: living larvae at 21 days were considered as diapausing. The diapause rate was calculated per month as the number of living larvae at 21 days divided by the number of living larvae placed initially in the emergence boxes. Some larvae were parasitized by either two species of *Platygastridae* or one species of *Pteromalidae*. The number of parasitized larvae (measured by the number of emerged parasitoids) was excluded from the calculation of the diapause rate.

#### *Diapause duration under constant temperature*

The objective of this laboratory study was to compare the effect of two constant temperatures, 20°C and 26°C, on the diapause duration of larvae collected in winter or in summer. These temperatures corresponded to the weekly mean soil temperature at a 3 cm depth below a mango canopy, in winter and in summer respectively (Supplementary data 4). Larvae were collected at the Saint-Gilles orchard described above. Two thousand five hundred larvae were collected from inflorescences during four days in winter (August 2011) as described above. Larvae collected a same day from several trees were pooled before being placed in emergence boxes. Ten emergence boxes were set up with 250 larvae in each. Five emergence boxes were placed at 20°C and five at 26°C. One thousand and eighty larvae were similarly collected from young leaves in summer (March 2012). Eleven emergence boxes were set up with 100 larvae in each (except one with 80 larvae). Five emergence boxes were placed at 20°C and six at 26°C. The photoperiod was set to LD 12:12. For larvae collected in summer 2012, the number of emerged adults was recorded weekly during 22 weeks. At week 22, the sand was sieved to find remaining larvae in diapause. For larvae collected in winter 2011, the number of adults emerged was recorded weekly during 48 weeks. At week 48, the sand was sieved to find remaining larvae in diapause. For analysis of winter 2011 data, we considered that the number of diapausing individuals at week 22 was the sum of the number of adults emerged from the week 22 and of the number of larvae in diapause at week 48. This approximation, which neglected the mortality of diapausing larvae between weeks 22 and 48, was used to allow comparison between summer and winter experiments and with the next experiment described below.

#### *Effect of temperature decrease on diapause duration*

To determine whether the temperature decrease at the beginning of winter triggered the post-diapause emergence, a laboratory study was carried out to assess the effect of a temperature decrease, from 26°C to 20°C, on post-diapause emergence of larvae collected in winter or in summer. Larvae were collected simultaneously with the larvae used in the previous experiment at constant temperature.

Two thousand five hundred larvae were collected from inflorescences during four days in winter (August 2011) as described above. Larvae collected a same day from several trees were pooled before being placed in emergence boxes. Ten emergence boxes were set up with 250 larvae in each and stored at 26°C. After six weeks at 26°C, five emergence boxes were transferred to 20°C. The remaining five emergence boxes were transferred to 20°C after nine weeks at 26°C. One thousand one hundred larvae were collected from leaves during four days in summer (March 2012) as described above. Larvae collected a same day from several trees were pooled before being placed in emergence boxes. Eleven emergence boxes were set up with 100 larvae in each and stored at 26°C. After nine weeks at 26°C, five emergence boxes were transferred to 20°C. The remaining five emergence boxes were transferred to 20°C after 13 weeks at 26°C. The number of emerged adults was recorded weekly during 22 weeks. Twenty-two weeks after the beginning of the experiment, the sand was sieved to check the presence of diapausing larvae. For statistical analysis, emergences of larvae from the first experiment at a constant temperature of 26°C were used as a control.

### *Statistical analysis*

To assess the seasonal variation of diapause rates, data from the emergence boxes were summed within each month. Diapause rates were compared between months using pairwise Fisher's exact tests. Significance of the tests was assessed using a 5% False Discovery Rate (Benjamini and Hochberg 1995) to control the experiment-wise Type-I error.

We tested the effect of the temperature regime on the duration to emergence of diapausing individuals. Because the experiments were stopped after 22 weeks, data were right-censored: the duration of diapause of larvae still in diapause 22 weeks after the beginning of the experiment was unknown. Analyses for right-censored data were performed with a parametric survival regression model which was fitted with an exponential distribution. The effect of the temperature regime on diapause duration was tested using a Wald Chi-square statistics. For the last experiment including a temperature decrease, the restricted mean was calculated and the comparisons performed only on individuals emerged between the week of temperature transfer and the week 22. Restricted means were calculated by setting to 22 weeks the duration of diapause of individuals still in diapause at week 22. Analyses were conducted using the R software, version 2.15.2 (R Development Core Team 2012).

## **Results**

### *Dynamics of the adult emergence in natural conditions*

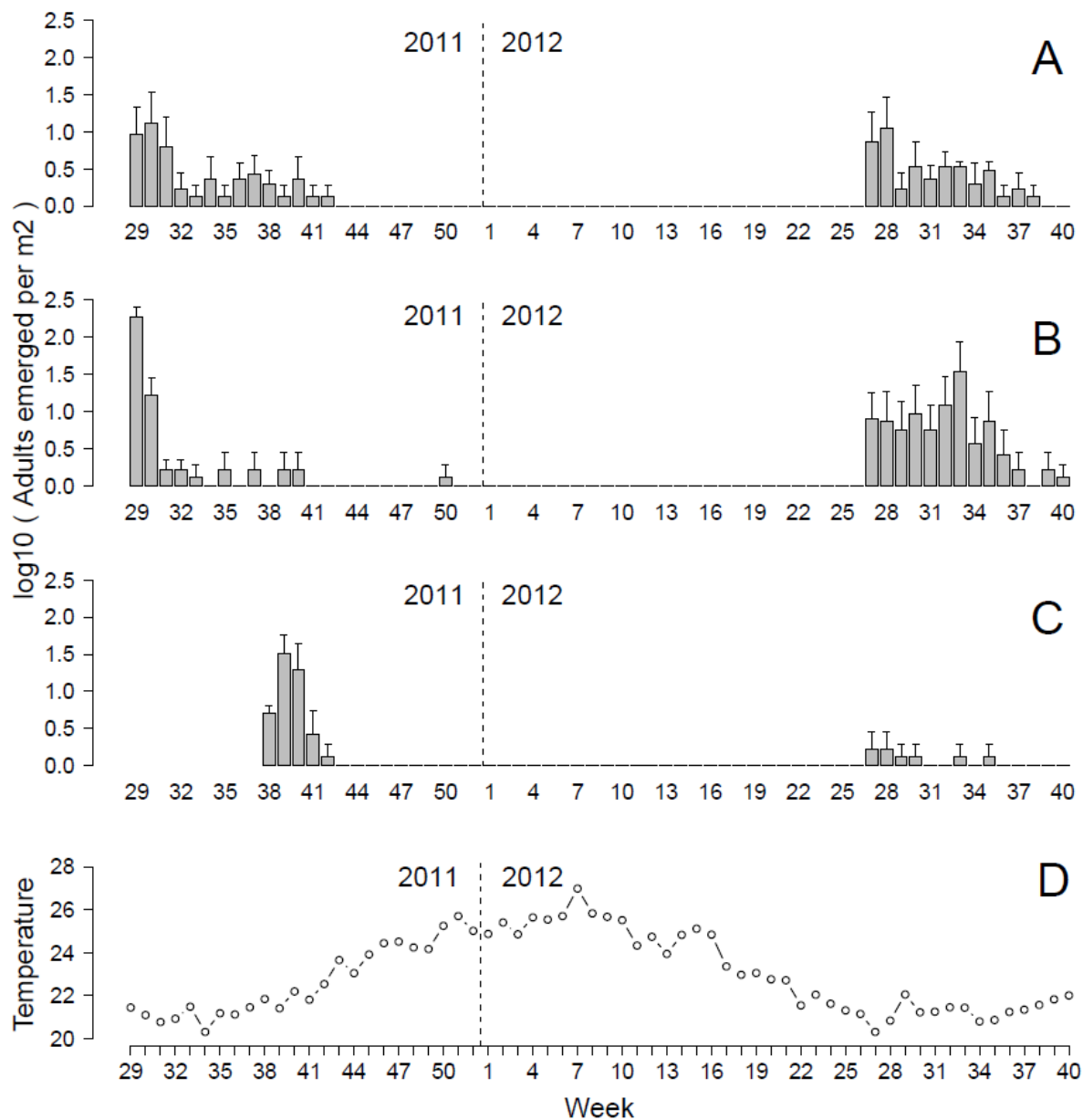
In natural conditions, adult emergence from the soil was observed 50 weeks after the trap installation (Figure 1A & 1B), demonstrating the existence of diapause. In traps of set A (Figure



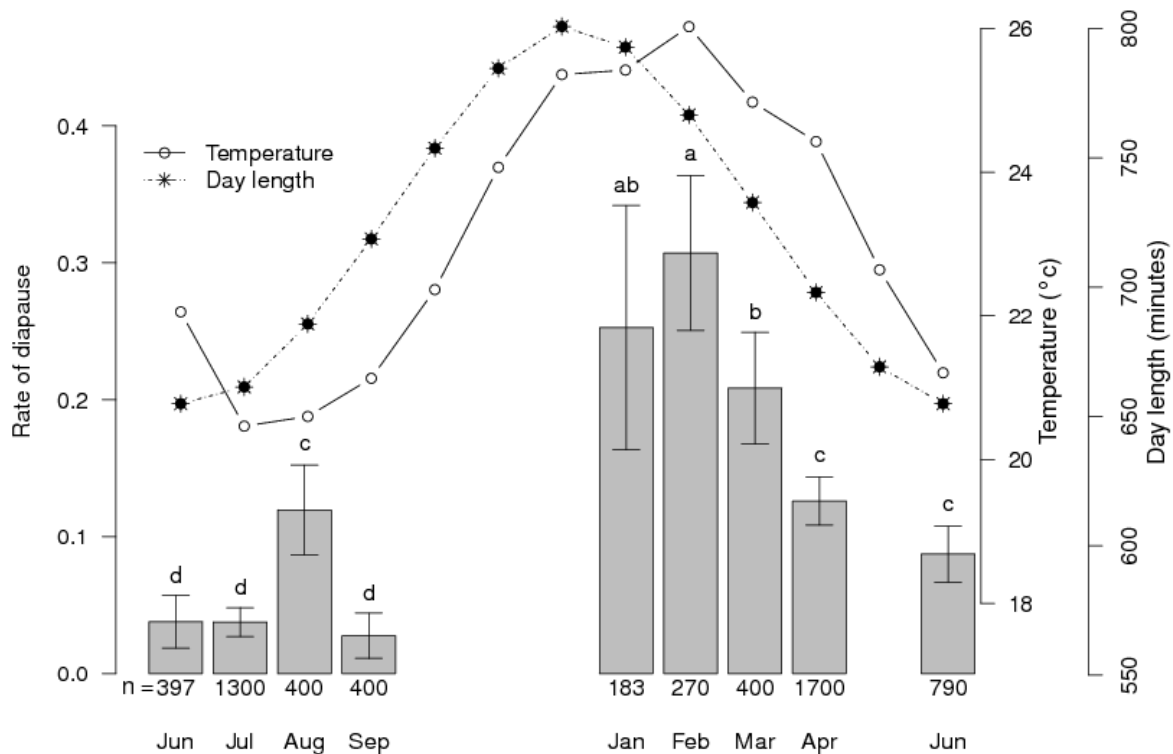
1A), adults emerging in 2012 corresponded to individuals in prolonged diapause, which entered in diapause before winter 2011. At the beginning of the 2012 winter flowering season, adult emergences in the three trap sets (A, B, C) were synchronized at the week 27. The mean air temperature of the week 27 was 20.9°C, the lowest weekly temperature recorded in 2012 (Figure 1D). Emergence of diapausing individuals was never observed during a period where mean air temperature was above 22.0°C, i.e. from week 43 in 2011 to week 26 in 2012, with the unique exception of one adult emerged on week 50 in 2011 (Figure 1B).

#### *Seasonal changes in diapause rate induced in natural conditions*

Rates of diapause observed from June 2011 to June 2012 varied significantly between months and ranged from 0.03 to 0.31 (Figure 2). The rate of diapause ranged from 21% to 31% from January to March and was significantly higher than during the other months. This period corresponded to the highest temperature (monthly mean air temperature above 24°C) and day length above 12h (Figure 2). The lowest rates of diapause were observed in winter from June to September.



Chap. IV - Figure 1: Log<sub>10</sub> transformed weekly number of adults emerged (mean ± SD) per square meter of soil below mango trees from July 2011 to October 2012 and caught with an emergence trap. Traps were installed under the trees at different dates and phenological stages: (A) beginning of the flowering period, under trees without recent growth or flowering activity; (B) beginning of the flowering period, under flowering trees with a recent gall midge contamination; (C) end of the flowering period, under flowering trees with a recent gall midge contamination. The mean weekly air temperature during the experiment is represented on the graph D.



Chap. IV - Figure 2: Monthly rate (mean±SD) of diapause of *P. mangiferae* at 20°C and LD 12:12 from June 2011 to June 2012. The dotted line indicates the mean monthly day length and the solid line indicates the mean monthly air temperature. Monthly rates of diapause with the same letter are not significantly different (pairwise Fisher's exact tests,  $P < 0.05$ ). n: number of larvae sampled.

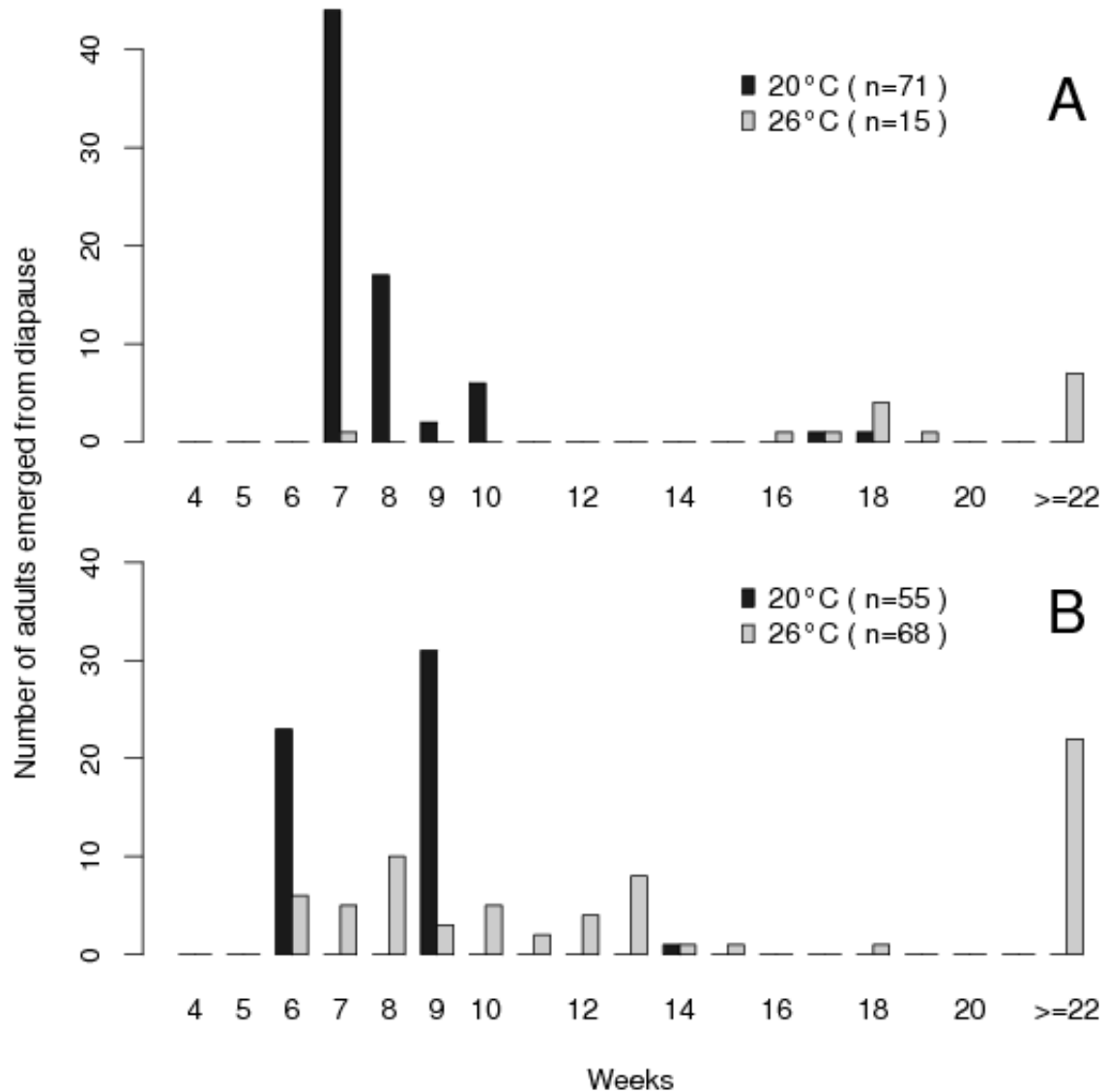
#### *Diapause duration under constant temperature*

For larvae collected in winter, 71 and 15 adults emerged from diapause at 20°C and 26°C respectively (Figure 3). Duration of diapause at 20°C (restricted mean:  $6.9 \pm 0.2$  weeks) was significantly shorter ( $\text{Chisq} = 28.5$ ,  $\text{df} = 1$ ,  $P < 0.001$ ) than the duration of diapause at 26°C (restricted mean:  $18.0 \pm 1.0$  weeks).

For larvae collected in summer, 55 and 49 adults emerged from diapause at 20°C and 26°C respectively (Figure 3). The duration of diapause at 20°C (restricted mean:  $6.8 \pm 0.2$  weeks) was significantly shorter ( $\text{Chisq} = 37.9$ ,  $\text{df} = 1$ ,  $P < 0.001$ ) than the duration of diapause at 26°C (restricted mean:  $10.7 \pm 0.4$  weeks).

The duration of diapause at 20°C for larvae collected in winter was not significantly different ( $\text{Chisq} < 0.001$ ,  $\text{df} = 1$ ,  $P = 0.99$ ) than the duration of diapause for larvae collected in summer. On the opposite, the duration of diapause at 26°C for larvae collected in winter was

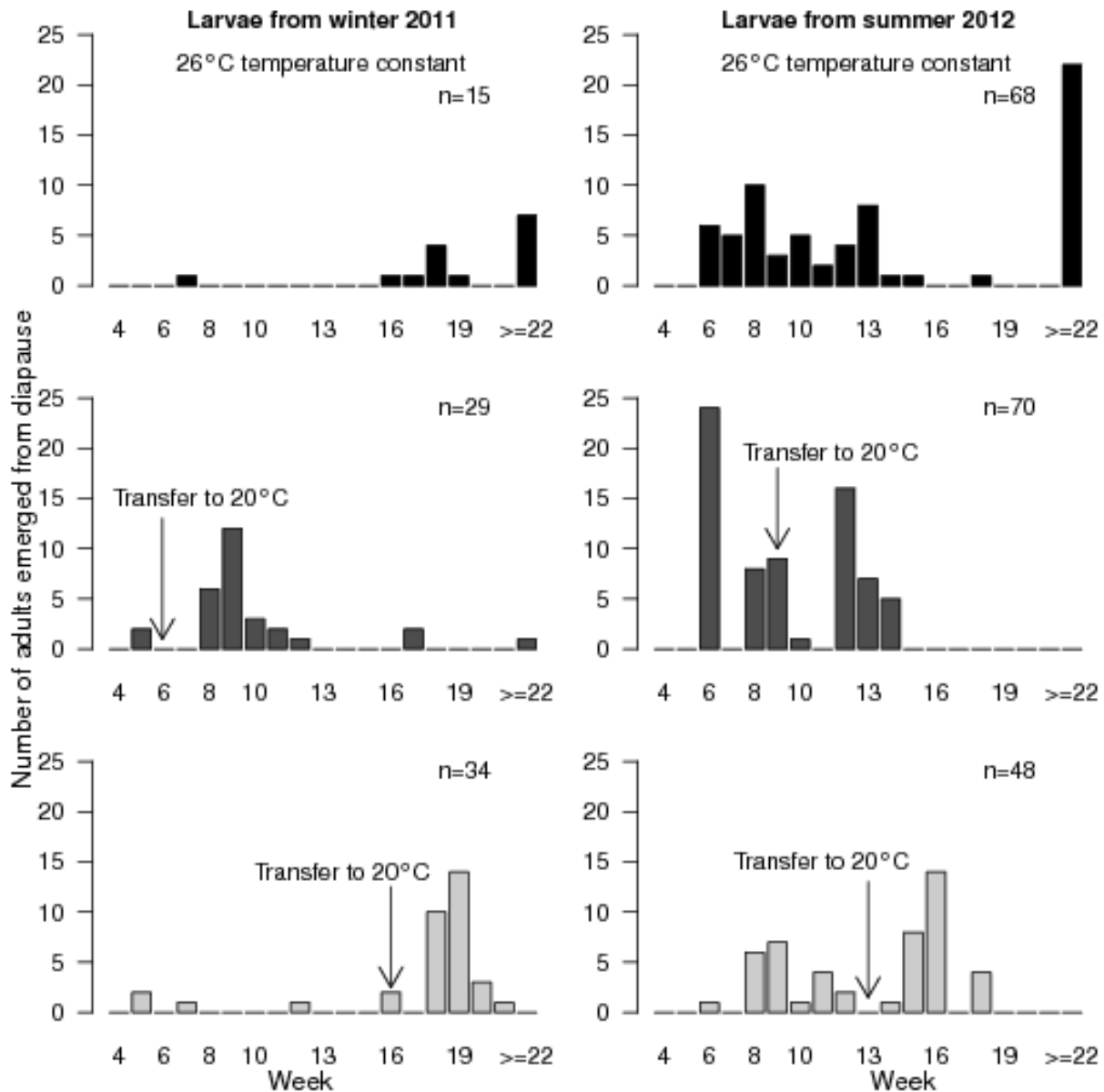
significantly longer ( $\text{Chisq} = 7.4$ ,  $\text{df} = 1$ ,  $P = 0.006$ ) than the duration of diapause for larvae collected in summer.



Chap. IV - Figure 3: Number of adults emerged weekly from larvae in diapause at the constant temperature of 20°C (black) and 26°C (grey) for larvae collected in winter 2011 on inflorescences (A) and for larvae collected in summer 2012 on young leaves (B). n: number of individuals in diapause (emerged and found in the sand at week 22).

### *Effect of temperature decrease on diapause duration*

In all experiments, the transfer of larvae from 26°C to 20°C decreased the duration of diapause, a grouped emergence of adults from larvae in diapause occurred two to three weeks after the transfer from 26°C to 20°C (Figure 4).



Chap. IV - Figure 4: Number of adults emerged weekly from larvae in diapause for larvae collected in winter 2011 on inflorescences (left column) and for larvae collected in summer 2012 on young leaves (right column): first line at the constant temperature 26°C, second and third lines with transfer from 26°C to 20°C. n: number of individuals in diapause (emerged and found in the sand at week 22).

For larvae collected in winter, after six weeks at 26°C, the time to emerge was significantly shorter (Chisq=13.2, df=1,  $P < 0.001$ ) for individuals transferred to 20°C (restricted mean:  $3.3 \pm 0.6$  weeks) than the duration of diapause for individuals kept at 26°C (restricted mean:  $13.4 \pm 0.7$  weeks).

weeks). After 16 weeks at 26°C, the time to emerge was significantly shorter (Chisq = 5.1, df = 1,  $P = 0.02$ ) in individuals transferred to 20°C (restricted mean,  $1.8 \pm 0.1$  weeks) than for larvae kept at 26°C (restricted mean,  $4.0 \pm 0.7$  weeks).

For larvae collected in summer, after nine weeks at 26°C, the time to emerge was significantly shorter (Chisq=23.3, df=1,  $P < 0.001$ ) for individuals transferred to 20°C (restricted mean:  $2.6 \pm 0.1$  weeks) than the duration of diapause for individuals kept at 26°C (restricted mean:  $8.4 \pm 0.8$  weeks). After 13 weeks at 26°C, the time to emerge was significantly shorter (Chisq=39.1, df=1,  $P < 0.001$ ) in individuals transferred to 20°C (restricted mean,  $2.0 \pm 0.1$  weeks) than for individuals kept at 26°C (restricted mean,  $8.5 \pm 0.5$  weeks).

## Discussion

In this study, we demonstrated the occurrence of diapause all-year round for *P. mangiferae* in natural conditions and showed that its duration can be longer than one year. The highest rates of diapause induction were observed during summer for larvae collected from leaves. In controlled conditions, we showed diapause duration was longer at 26°C than at 20°C. At 26°C, the duration of diapause changed with the date of larvae collection. A temperature decrease from 26°C to 20°C triggered off the emergence of diapausing individuals.

This diapause, which dormant phase overlaps with the warmer part of the year, can be compared to a summer diapause in temperate zone (Masaki 1980). Larval diapause of *P. mangiferae* has already been mentioned in tropical areas of India by Prasad (1971). Other Cecidomyiidae have developed diapause, both in temperate zones as the Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say) (Benoit et al. 2010) and in the tropics as *Contarinia sorghicola* (Coquillett) (Baxendale and Teetes 1983; Denlinger 1986).

Diapause of *P. mangiferae* was induced all-year round at a rate lower than 0.3. The facultative diapause is congruent with the presence of populations all year round in orchards as observed by Amouroux et al. (2013). Similarly, permanent populations of *P. mangiferae* were observed in the equatorial area of India (Prasad 1971). The prerequisite to maintain permanent populations is the availability of resources all year round. In Jamaica, the tropical gall midge *Asphondylia boerhaaviae* (Mohn) can produce up to 17 generations per year by shifting on three host-plants (Freeman and Geoghagen 1989). In Reunion Island, mango flowering occurs during the fresh dry season from July to October and vegetative growth occurs from August to May (Dambreville et al. 2013). The mango tree is characterized by phenological asynchronisms, i.e. the appearance of new inflorescences and new growth units occur mainly during the flowering and the vegetative growth seasons respectively (Davenport and Nuñez-Elisea 2009), but erratic vegetative

flushes or flowering allow the presence of grouped or scattered resources in an orchard all year round. Exploitable mango resources are then continuously available for *P. mangiferae*, due to its ability to feed on both inflorescences and young leaves (Amouroux et al. 2013), allowing permanent populations in the orchards.

The highest rates of diapause were observed in summer for larvae collected from leaves, whereas the lowest rates were observed for larvae collected in winter from inflorescences. This variation in the rate of diapause could be due to abiotic cues (photoperiod and/or temperature) and/or biotic cues (nature and physiology of mango organ hosting the larvae). Although variations in temperature and photoperiod are more limited in the tropics than in temperate areas, these cues have been showed to control the incidence of diapause induction in numerous tropical insects from several orders (Denlinger 1986). The highest rate of diapause was observed in summer when the weekly mean air temperature was the highest and the day length was longer than 12h. The facultative aspect of the diapause in Reunion is contradictory with the observation of Prasad (1971) who reported that in subtropical conditions of India (Allahabad), all larvae entered in diapause at the end of the flowering season in late May. The amplitude of variation in day length is similar in Allahabad (latitude 25°N) and in Reunion island (latitude 21°S) and can therefore not account for the difference observed in the rate of diapause induction between the two locations. One explanation could be the lowest temperatures observed in Reunion Island. In Allahabad, monthly mean of maximum temperature is above 41°C in May (Hong Kong Observatory 2012) when the whole population of *P. mangiferae* enters in diapause, while in Reunion Island, the monthly mean of maximum temperature never exceed 32°C. The monthly variation in the rate of diapause in Reunion could also be due to biotic cues, i.e. mango organs. The nutritional quality of the larval diet can have direct effect on diapause induction: low-quality diet can favor diapause induction (Hunter and McNeil 1997). So, host-plant quality influences diapause in *Byasa alcinous* Klug (Lepidoptera: Papilionidae) which the incidence of pupal diapause was greater with tough leaves than with soft leaves (Takagi and Miyashita 2008). Nevertheless, in our natural conditions, we could not separate the effects of season and mango due to the seasonality of the mango phenology: inflorescences occurred in winter and leaves in summer. Moreover, in laboratory conditions, the date of diapause induction (summer vs. winter) modified the pattern of emergence at a constant temperature of 26°C. This suggests that different mechanisms of diapause could be induced in summer and winter. Differences in gene expression and physiological changes were yet observed between summer and winter diapause of the onion maggot *Delia antiqua* (Meigen) (Diptera: Anthomyiidae) (Hao et al. 2012). Moreover, one species can exhibit different mechanisms of diapause induction as *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) which diapause could be induced by a



combination of temperature and photoperiod (Mironidis and Savopoulou-Soultani 2012) or by high temperature only (Liu et al. 2006; Nibouche 1998). Further studies must be conducted to determine on controlled conditions the biotic and abiotic cues involved in the diapause induction and the diapause maturation of *P. mangiferae*.

In natural conditions, we observed that post-diapause emergence begins whatever the period of diapause induction when mean air temperature was 20.9°C, the lowest of the winter 2012. Laboratory conditions confirmed that low temperature synchronized emergence. Constant temperature of 26°C delayed emergence of *P. mangiferae* while transfer from 26°C to 20°C triggered off grouped emergence of adults, whatever the date of diapause induction. These characteristics ensure the synchronization of emergence of larvae in diapause. In natural conditions, some adults emerged from soil more than one year after the trap installation and were exposed for at least the second time to winter conditions. These individuals, which did not emerge during favorable conditions for diapause termination in winter 2011, were on prolonged diapause, diapause which lasts more than one year (Danks 1987; Hanski 1988). The diapause of *P. mangiferae* was particularly adapted to the climate and the phenological cycle of mango trees in Reunion Island. The synchronization with the host plant is vital for phytophagous insect (Yukawa 2000). The synchronization of *P. mangiferae* emergence by cool temperature corresponded to the imminent presence of mango inflorescences as mango flowering is induced by cool temperatures (Davenport and Nuñez-Elisea 2009). However, inflorescences are not regular resources from one year to another because of the alternate bearing habit of the mango tree (Davenport and Nuñez-Elisea 2009). Prolonged diapause could be an alternative to overtake the years with low inflorescence resources. This strategy is characteristic of many phytophagous insects that have wide fluctuations of abundance with periodical outbreaks (Saulich 2010) and occurs commonly for insects in unpredictably changing environments or with unpredictable resources (Higaki and Toyama 2012).

The present study confirmed the existence of diapause in *P. mangiferae* and underlined the mechanisms involved in diapause termination. However, the biotic and abiotic cues implied in the diapause induction must be study more precisely in controlled conditions. The mango blossom gall midge and Reunion island conditions are particularly adapted to study the ecological role and the mechanisms controlling the facultative and the prolonged diapause of a gall midge associated with trees in an unpredictable habitat offering permanent resources.

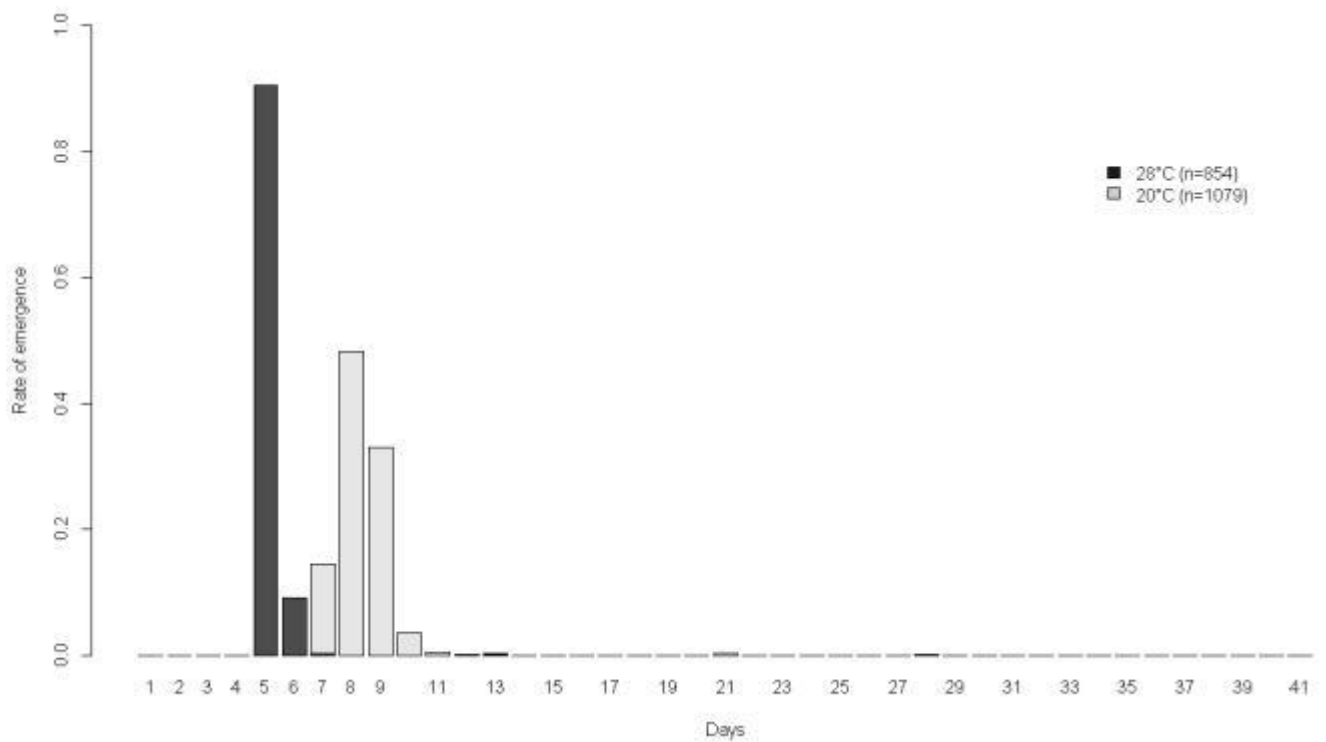
## Supplementary data



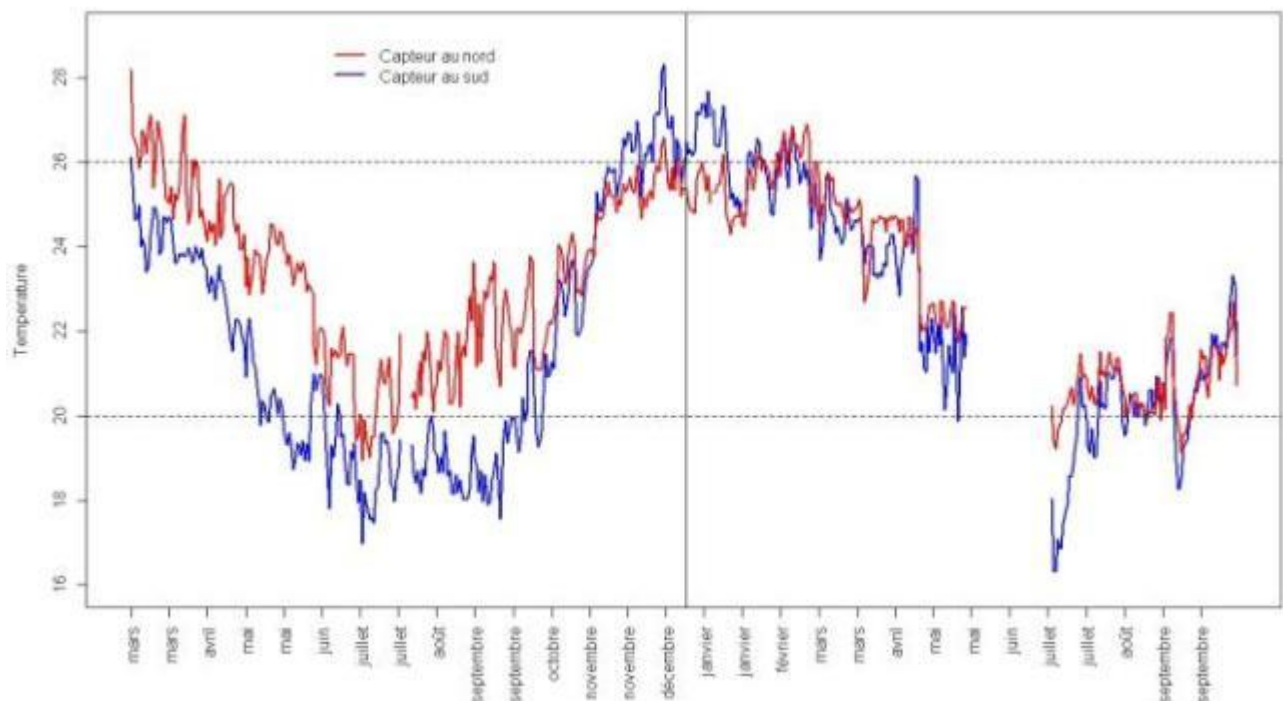
SD 1: Modified soil emergence traps used to record the emergence of adults from the soil



SD 2: Mosquito breeder BioQuip (image from bioquip.com)



SD 3: Adult emergence at two temperatures, 20°C and 28°C, during 41 days for larvae collected on inflorescences in winter.



SD 4: Weekly soil temperature at 3cm depth during 19 months on the border of a mango tree facing the North (red line) and South (blue line) directions at Saint-Pierre, Reunion Island.

## IV.2. Conclusion du chapitre

L'étude de la diapause de la cécidomyie des fleurs du manguier nous permis de mettre en évidence que (i) la diapause était induite toute l'année quelles que soient les conditions de photopériode et de température et quel que soit l'organe de manguier, (ii) le taux d'entrée en diapause était plus élevé en été qu'en hiver mais qu'il n'excédait pas 30%, (iii) la durée de la diapause était de six semaines à plus d'un an, (iv) les sorties de diapause se produisaient tout au long de l'hiver pour des températures hebdomadaires moyennes comprises en 20,9° et 22,0°C, (v) la durée de diapause était plus courte à une température basse (20°C) qu'à une température élevée (26°C), (vi) une baisse de température en milieu contrôlé synchronisait les émergences.

## Références bibliographiques

- Amouroux P, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2013) Invasive mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations. *Biological Invasions* 15 (8):1677-1693.
- Baxendale FP, Teetes GL (1983) Factors Influencing Adult Emergence from Diapausing Sorghum Midge, *Contarinia sorghicola* (Diptera: Cecidomyiidae). *Environmental Entomology* 12:1064-1067.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate - A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57 (1):289-300.
- Benoit JB, Morton PK, Cambron SE, Patrick KR, Schemerhorn BJ (2010) Aestivation and diapause syndromes reduce the water balance requirements for pupae of the Hessian fly, *Mayetiola destructor*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 136 (1):89-96.
- Dambreville A, Normand F, Lauri P-É (2013) Plant growth co-ordination in natura: a unique temperature-controlled law among vegetative and reproductive organs in mango. *Functional Plant Biology* 40 (3):280-291.
- Danks HV (1987) *Insect Dormancy: an Ecological Perspective*. Biological Survey of Canada Monographs. Biological Survey of Canada.
- Danks HV (2007) *The elements of seasonal adaptations in insects*. Entomological Society of Canada 139:1-44.
- Davenport TL, Nuñez-Elisea R (2009) Reproductive Physiology. In: Litz RE (ed) *The Mango - Botany, production and uses*. 2nd edition edn. CAB International, Wallingford, UK, pp 97-169.
- Denlinger DL (1986) Dormancy in tropical insects. *Annual Review of Entomology* 31:239-264.
- Denlinger DL (2002) Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47:93-122.
- Freeman BE, Geoghagen A (1989) A population study in Jamaica on the gall-midge *Asphondylia boerhaaviae*: A contribution to spatial dynamics. *Journal of Animal Ecology* 58 (2):367-382.

- Goehring L, Oberhauser KS (2002) Effects of photoperiod, temperature, and host plant age on induction of reproductive diapause and development time in *Danaus plexippus*. *Ecological Entomology* **27** (6):674-685.
- Hanski I (1988) Four kinds of extra long diapause in insects: A review of theory and observation. *Ann Zool Fennici* **25**:37-53.
- Hao YJ, Li WS, He ZB, Si FL, Ishikawa Y, Chen B (2012) Differential gene expression between summer and winter diapause pupae of the onion maggot *Delia antiqua*, detected by suppressive subtractive hybridization. *Journal of Insect Physiology* **58** (11):1444-1449.
- He H-M, Xian Z-H, Huang F, Liu X-P, Xue F-S (2009) Photoperiodism of diapause induction in *Thyrassia penangae* (Lepidoptera: Zygaenidae). *Journal of Insect Physiology* **55** (11):1003-1008.
- Higaki M, Toyama M (2012) Evidence for reversible change in intensity of prolonged diapause in the chestnut weevil *Curculio sikkimensis*. *Journal of Insect Physiology* **58** (1):56-60.
- Hong Kong Observatory (2012) [http://www.weather.gov.hk/wxinfo/climat/world/eng/asia/india/hyderabad\\_e.htm](http://www.weather.gov.hk/wxinfo/climat/world/eng/asia/india/hyderabad_e.htm). Accessed 2013-04-02
- Hunter MD, McNeil JN (1997) Host-plant quality influences diapause and voltinism in a polyphagous insect herbivore. *Ecology* **78** (4):977-986.
- Jiang XF, Huang SH, Luo LZ, Liu Y, Zhang L (2010) Diapause termination, post-diapause development and reproduction in the beet webworm, *Loxostege sticticalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology* **56** (9):1325-1331.
- Kolesik P, Rice AD, Bellis GA, Wirthensohn MG (2009) *Procontarinia pustulata*, a new gall midge species (Diptera: Cecidomyiidae) feeding on mango, *Mangifera indica* (Anacardiaceae), in northern Australia and Papua New Guinea. *Australian Journal of Entomology* **48**:310-316.
- Kostal V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* **52** (2):113-127.
- Lehmann P, Lyytinen A, Sinisalo T, Lindstrom L (2012) Population dependent effects of photoperiod on diapause related physiological traits in an invasive beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Journal of Insect Physiology* **58** (8):1146-1158.
- Liu Z, Gong P, Li D, Wei W (2010) Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by larval host plants: pupal weight is important. *Journal of Insect Physiology* **56** (12):1863-1870.
- Liu ZD, Gong PY, Wu KJ, Sun JH, Li DM (2006) A true summer diapause induced by high temperatures in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* **52** (10):1012-1020.
- Masaki S (1980) Summer Diapause. *Annual Review of Entomology* **25** (1):1-25.
- Mironidis GK, Savopoulou-Soultani M (2012) Effects of constant and changing temperature conditions on diapause induction in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research* **102** (2):139-147.
- Nibouche S (1998) High temperature induced diapause in the cotton bollworm shape *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **87** (3):271-274.
- Pezhman H, Askari M (2004) A study on the biology of mango inflorescence midge in Hormozgan province. *Applied Entomology and Phytopathology* **72** (1):19-29.
- Prasad SN (1971) *The Mango Midge Pests*. Cecidological Society of India, Allahabad, India. 172pp.

- Prasad SN, Grover P (1974) Population fluctuation of *Erosomyia indica* Grover. *Cecidologia indica IX* (vol 1&2):1-38.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0. Website <http://www.R-project.org/>. Vienna, Austria.
- Ragland GJ, Egan SP, Feder JL, Berlocher SH, Hahn DA (2011) Developmental trajectories of gene expression reveal candidates for diapause termination: a key life-history transition in the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Journal of Experimental Biology* **214** (23):3948-3959.
- Raman A (2012) Adaptive radiation and diversification in gall-inducing insects in the Indian subcontinent: search for a pattern. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* **59** (2):177-187.
- Saulich A (2010) Long life cycles in insects. *Entomological Review* **90** (9):1127-1152.
- Shintani Y, Hirose Y, Terao M (2011) Effects of temperature, photoperiod and soil humidity on induction of pseudopupal diapause in the bean blister beetle *Epicauta gorhami*. *Physiological Entomology* **36** (1):14-20.
- Takagi S, Miyashita T (2008) Host plant quality influences diapause induction of *Byasa alcinous* (Lepidoptera : Papilionidae). *Annals of the Entomological Society of America* **101** (2):392-396.
- Tanzubil PB, Mensah GWK, McCaffery AR (2000) Diapause initiation and incidence in the millet stem borer, *Coniesta ignefusalis* (Lepidoptera: Pyralidae): the role of the host plant. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 365-371.
- Tauber MJ, Tauber CA, Masaki S (1986) *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, Oxford. 414pp.
- Terao M, Hirose Y, Shintani Y (2012) Effects of temperature and photoperiod on termination of pseudopupal diapause in the bean blister beetle, *Epicauta gorhami*. *Journal of Insect Physiology* **58** (5):737-742.
- Uechi N, Yukawa J (2006) Life History Patterns and Host Ranges of the Genus *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae). In: *Galling Arthropods and Their Associates*. Springer, Tokyo, Japan, pp 275-285.
- Vincenot D, Normand F (2009) *Guide de production intégrée de mangues à la Réunion*. CIRAD et Chambre d'Agriculture, Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France. 121pp.
- Xiao HJ, Mou FC, Zhu XF, Xue FS (2010) Diapause induction, maintenance and termination in the rice stem borer *Chilo suppressalis* (Walker). *Journal of Insect Physiology* **56** (11):1558-1564.
- Yukawa J (2000) Synchronization of gallers with host plant phenology. *Population Ecology* **42** (2):105-113.

### V.1. Présentation

Le troisième objectif de la thèse est de déterminer les modes et les caractéristiques de la dispersion de *P. mangiferae* entre et au sein de vergers de manguiers.

La dispersion des insectes peut être liée à des comportements migratoires ou à la recherche de plantes-hôtes (Byrne *et al.* 2013). Les déplacements migratoires peuvent être actifs avec un vol dirigé ou bien passifs, portés par le vent. Trois paramètres sont essentiels pour déterminer si la dispersion est active ou passive. Il s'agit de la taille de l'insecte, de sa période de vol dans la journée et de sa hauteur de vol (Taylor 1974).

Afin d'évaluer les capacités de vol des insectes et de suivre leurs déplacements, de nombreuses méthodes ont été développées en laboratoire et en milieu naturel. En laboratoire, les tunnels de vol et les moulins de vol sont largement utilisés (Aak *et al.* 2010; Taylor *et al.* 2010). En milieu naturel, les techniques radars et radiotélémetriques se sont fortement développées (Reynolds & Riley 2002) mais ne sont pas applicables à toutes les espèces entre autres à cause de problèmes de miniaturisation du matériel. La méthode de Capture-Marquage-Recapture est également largement utilisée (Meats & Smallridge 2007). Des outils de biologie moléculaire, tels que les marqueurs moléculaires permettent d'évaluer les capacités de dispersion en quantifiant les flux de gènes entre populations (Loxdale & Lushai 2001). La modélisation est un autre outil qui peut permettre d'étudier la capacité de dispersion mais que les interactions entre individus ou avec leur habitat (Vinatier *et al.* 2011).

Les cécidomyies sont de petits insectes avec une durée de vie courte et leur plante-hôte tient une place cruciale dans leur cycle de vie (Yukawa 2000). La plante-hôte peut aussi entraîner une modification de leur comportement de dispersion (Withers *et al.* 1997). La difficulté d'observer directement les adultes (Olfert *et al.* 2009) et leur durée de vie très courte (2-3 jours), nous a orientées vers l'utilisation de méthodes indirectes pour cette étude. Nous avons donc opté pour une approche par modélisation et avons développé un modèle stochastique et mécaniste de dispersion basé sur le résultat de la dispersion des femelles c'est-à-dire sur la distribution spatio-temporelle des larves produites (génération F1).

Pendant toute la durée de la floraison (environ trois mois), le sol d'un verger de 0,5 ha a été entièrement bâché, ce qui a eu pour effet d'empêcher toute émergence de *P. mangiferae* dans ce verger (Figure 0). Les larves observées ne pouvaient donc provenir que de femelles extérieures à ce verger. Des suivis de la phénologie des manguiers et des populations de larves de cécidomyies étaient réalisés à l'échelle de chaque arbre. Chaque semaine, le suivi des manguiers a permis de connaître le stade phénologique et le nombre de ressources (inflorescences et jeunes feuilles) présentes sur chaque manguiers du verger. Deux fois par semaine, le nombre de larves de cécidomyies était compté dans deux pièges placés sous les arbres. Cette expérimentation a été réalisée pendant les floraisons des années 2010, 2011 et 2012.





Chap. V - Figure 0 : Verger de manguiers dont le sol a été bâché. Crédit : P. Amouroux

Nous avons ensuite modélisé le nombre de larves capturées par les pièges en prenant en compte la ressource présente dans le verger. Le modèle comprend quatre étapes :

- (i) *l'arrivée des femelles dans le verger.* Deux hypothèses ont été testées : (1) les femelles se posent uniformément en tout point du verger ; (2) le point de chute des femelles dans le verger est influencé par la quantité de ressources présentes autour de ce point.
- (ii) *le déplacement des femelles à l'intérieur du verger* est dirigé par l'attractivité de la ressource qui est définie par le type et par le stade phénologique de la ressource. Cette attractivité décroît avec la distance.
- (iii) *la ponte et le développement des larves* sont basés sur des données bibliographiques. Un facteur de survie des larves pendant le développement est pris en compte.
- (iv) *l'interception des larves par les pièges.* L'efficacité des pièges à intercepter les larves dépend du type et du stade phénologique de la ressource présente au-dessus du piège.

Les paramètres estimés du modèle sont donc le nombre de femelles arrivant dans le verger à chaque date, l'attractivité de la ressource avant l'arrivée (pour la deuxième hypothèse uniquement), l'attractivité de la ressource en fonction de son type et de son stade phénologique, le facteur de décroissance de cette attractivité en fonction de la distance, la survie pendant le développement des

larves, l'efficacité des pièges en fonction du type et du stade phénologique de la ressource (Annexe V).

Les résultats apportent des données sur la dispersion d'une cécidomyie dans un milieu semi-fermé (verger). Ils nous permettent de montrer l'influence de la ressource lors de l'arrivée des femelles dans le verger puis lors de la redistribution des femelles au sein du verger par vol actif. L'attractivité de la ressource et sa distance par rapport aux points d'arrivée des femelles sont deux éléments majeurs. Nous avons aussi montré que les capacités de vol actif semblaient cohérentes avec les études précédentes sur les cécidomyies.

Ce manuscrit sera soumis à *Ecological modelling*

## ARTICLE D: Immigration of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) in a mango orchard mediated by insect flight abilities and by mango resources: a modelling approach

P. Amouroux<sup>1,4</sup>, S. Nibouche<sup>2</sup>, H. Delatte<sup>2</sup>, J. Chadœuf<sup>3</sup> and F. Normand<sup>1</sup>

1, CIRAD, UPR HortSys, 97455 Saint-Pierre Cedex, Réunion Island, France

2, CIRAD, UMR PVBMT, 97410 Saint-Pierre, Réunion Island, France

3, INRA, UR546, Biostatistiques et Processus Spatiaux, 84914 Avignon, France

4, Université de la Réunion, UMR PVBMT, 97410 Saint-Pierre, Réunion Island, France

**Abstract:** Understanding the spatial ecology of pests becomes necessary to develop and implement innovative Integrated Pest Management (IPM) strategies. *Procontarinia mangiferae* (Felt) is a serious pest of mango worldwide which is able to attack both inflorescences and young leaves. The characteristics of *P. mangiferae* dispersion are not known. Adult gall midges are too tiny and fragile flies to follow directly their dispersion. Modelling is an indirect approach which can give access to dispersal mechanisms and to effects of the habitat. Our objectives were (i) to investigate the ability of *P. mangiferae* females to contaminate a new orchard from neighbouring orchards, and (ii) to estimate the role of mango resources in female dispersion. A stochastic and mechanist model was developed taking account (i) the arrival of females in the orchard, (ii) the displacement to the resource within the orchard, (iii) the egg-laying and larval development, and (iv) the efficiency of interception of the larvae by the trap. Two hypotheses were tested for the arrival of females: an arrival either uniformly distributed in the orchard or driven by the mango resources. Our results showed that (i) during the flowering period, about 4000 females arrived meanly weekly in an orchard (0.5ha), (ii) the landing point of females depended on the quantity mango resource surroundings this point, (iii) after landing, females detected mango resource up to 6 m around it, (iv) the attractiveness of inflorescences increased from the budburst to the end of the flowering, (v) the attractiveness of the young leaves was lower than then attractiveness of inflorescences.

**Keywords:** Model, Cecidomyiidae, dispersion, trivial flight, pest, mango

Understanding the spatial ecology of pests becomes necessary to develop and implement innovative Integrated Pest Management (IPM) strategies (Vinatier *et al.* 2012). The spatial and temporal distribution of pest populations and the damages they cause to crops are influenced by their ability of dispersal. Dispersal of insects may be performed as migratory behaviours, or short

host-seeking flights called trivial flight (Byrne *et al.* 2013). As explained by Dingle and Drake (2007), migratory behaviours appeal to four different concepts, two relate to individual organisms and two concern populations. We retained the two concepts related to individual organisms: (i) a type of locomotory activity that is notably persistent, undistracted, and straightened out; (ii) a relocation of the animal that is on a much greater scale, and involves movement of much longer duration, than those arising in its normal daily activities. The migratory potential of an insect is influenced by its daily flight periodicity and by its body size but also by the layer of air in which it flies (Taylor 1974). The boundary layer concept defines a 'hypothetical layer of air near the ground within which it was supposed that insects were able to control their movements relative to the ground because their flight speed exceeded wind speed; outside the boundary layer insects would move downwind' (Taylor 1974). For small insects, downwind migration is the only feasible method and trivial flight is only possible in the shallow boundary layer for a very limited, local, scale (Taylor 1974).

Specific techniques have been developed to study insect flight ability in laboratory or in natural conditions. Computer-monitored flight mills can record directly flight performance (Taylor *et al.* 2010). However, the experimental device can modify the propensity for flight and the smaller the insect, the greater the impact (Taylor *et al.* 2010). The use of the photographic method to obtain instantaneous flight speeds represents a new and potentially valuable method (Taylor *et al.* 2010). Flight behaviour can also be studied in laboratory conditions with wind tunnel. It is for example a valuable tool to study the effect of attractants (Aak *et al.* 2010). However, data obtained in the laboratory may not be representative of flight performance or behaviour in the field (Taylor *et al.* 2010). In natural conditions, insect flight behaviours could be directly studied using electronic, remote-sensing and computer-based techniques (Reynolds & Riley 2002) as the harmonic radar for insects weighing at least 50 mg (Riley & Smith 2002). Mark-release-recapture (MRR) techniques were also useful to study the dispersal pattern (Meats & Smallridge 2007; Zhou *et al.* 2003). This technique requires the recapture of marked individuals, which could be difficult for small insects or on a large spatial scale. Biochemical and molecular biology techniques have been used to investigate insect movements and gene flows. Polymorphic molecular markers can be used to study the aerial movements allowing the insect population to find new habitats at a regional scale (Loxdale & Lushai 2001; Ridley *et al.* 2011). These methods were also useful to measure the dispersal distance for honey bee nuptial flight at a local scale (Jensen *et al.* 2005), or for queen ant flight at a fine scale (<100m) (Suni & Gordon 2010). Modelling is another indirect approach which can give access to dispersal mechanisms through the analysis of the temporal and/or spatial distribution of accessible variables. Vinatier *et al.* (2011) gave a review of mechanistic models (individual-based model, reaction-diffusion model, cellular automata) that offer the possibility to understand the mechanisms (insect behaviour) resulting in population spatial and temporal patterns, and to evaluate the effects of the habitat (fragmentation) and other factors (climate, ...). Stochastic and mechanistic models were used to test the role of wind in the *Culicoides* sp. dispersion during the 2006 bluetongue outbreak in North Western Europe (Sedda *et al.* 2012). This model was based

on wind data and assumptions on the flight behaviour of this species (random, downwind, upwind flights) and on the result of *Culicoides* sp. dispersion, i.e. the farms infested.

*Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) is an invasive species indigenous to India (CAB 2004; Gagné 2010) which is a serious pest of mango, *Mangifera indica* L., in India (Grover 1985), in Brazil (Barbosa 2005) and in Reunion Island (Amouroux & Normand 2010). By destroying mango inflorescences, this pest can reduce potential fruit yield by more than 70% (Etienne 1977; Peña *et al.* 1998; Whitwell 1993). *P. mangiferae* are able to feed on different resources of the mango tree, inflorescences and young leaves (Amouroux *et al.* 2013; Raman 2012). Each female has a life span of two or three days and can lay up to 150 eggs on mango resources (Prasad 1971). After hatching, larvae penetrate the mango resources. The third instar larvae leave the resources, fall to the ground and pupate in the soil. The cycle lasts 14 to 25 days (Pezhman & Askari 2004). The mango tree is characterized by phenological asynchronisms between trees within an orchard and within individual trees (Davenport & Nuñez-Elisea 2009). As a consequence, all trees do not flower or grow simultaneously, and the resource is available during a long period in the orchard, but according to a spatially and temporally heterogeneous pattern.

The characteristics of *P. mangiferae* dispersion are not known. However, they are of interest to develop IPM strategies, in particular to determine at which scale orchard protection would be effective. If *P. mangiferae* is able to fly between orchards, a coordinated protection at a large scale would be more effective than at the scale of the individual orchard. Adult gall midges are tiny, fragile flies usually 2-5 mm in length (Dorchin 2008). By analogy with the ability of dispersion of other Cecidomyiidae species, the long distance flight of *P. mangiferae* is probably passive (Miao *et al.* 2013; Olfert *et al.* 2009), while trivial flight could be orientated by the presence of resources as for *M. destructor* (Withers *et al.* 1997a). In wind tunnel, the Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say), a wheat gall midge, fully controlled its flight when the wind velocity was lower than 0.9 m/s (Withers & Harris 1997). In natural conditions, the dispersal behaviour within a wheat field (host-plant) and within an oat field (non-host plant) was studied by release-recapture of mated females within short distance (eight meters radius) and short duration (one day). Females moved faster through the non host-plants than through the host plants (Withers *et al.* 1997a). The flight dispersion of the Hessian fly was also estimated by releasing mated females in the middle of patches of young wheat plants distributed in a 27.5 m radius around the release point (Withers *et al.* 1997a). Three weeks later, the larval infestation indicated that mated females laid eggs in wheat patches at all distances from 0.9 to 27.5 m from the release point. Pattern of colonization of sorghum fields (500 m x 500 m) by females of *Contarinia sorghicola* was determined with transparent glue trap and showed that 95% of the population was within 65m from the edge (Lampo & Medialdea 1994). Kolesik (2000) observed that the female of the lentil gall midge *Contarinia lentis* Aczél laid eggs in an area of approximately 10 m<sup>2</sup> around its landing point. Miao *et al.* (2013) estimated long distance wind borne dispersal of the gall midge *Sitodiplosis mosellana* Géhin by coupling the density of gall midges at different heights (from the ground up to 75m) with a wind atmospheric model. They estimated that females could migrate passively with the wind across three hundred kilometres. These studies showed that the dispersal of gall midges is an interesting

question of research mixing migration behaviours and short host-seeking flights, which has been studied by direct (wind tunnel, MRR) and indirect (offspring survey, modelling) methods.

The objective of our study was to investigate the ability of *P. mangiferae* females to contaminate a new orchard from neighbouring orchards. To study the between and within orchard dispersion of *P. mangiferae*, we could not use remote-sensing systems (too tiny insect), MRR (too large scale and short life span) or molecular markers (inadequate polymorphism). We chose to measure and model the result of female arrival in a non-contaminated orchard, i.e. the number of larvae produced in inflorescences and young leaves. This modelling approach has the advantage to account for the interactions between mango gall midges and their resources (mango inflorescences and young leaves) which are spatially and temporally heterogeneous in the orchard.

## **Materiel and methods**

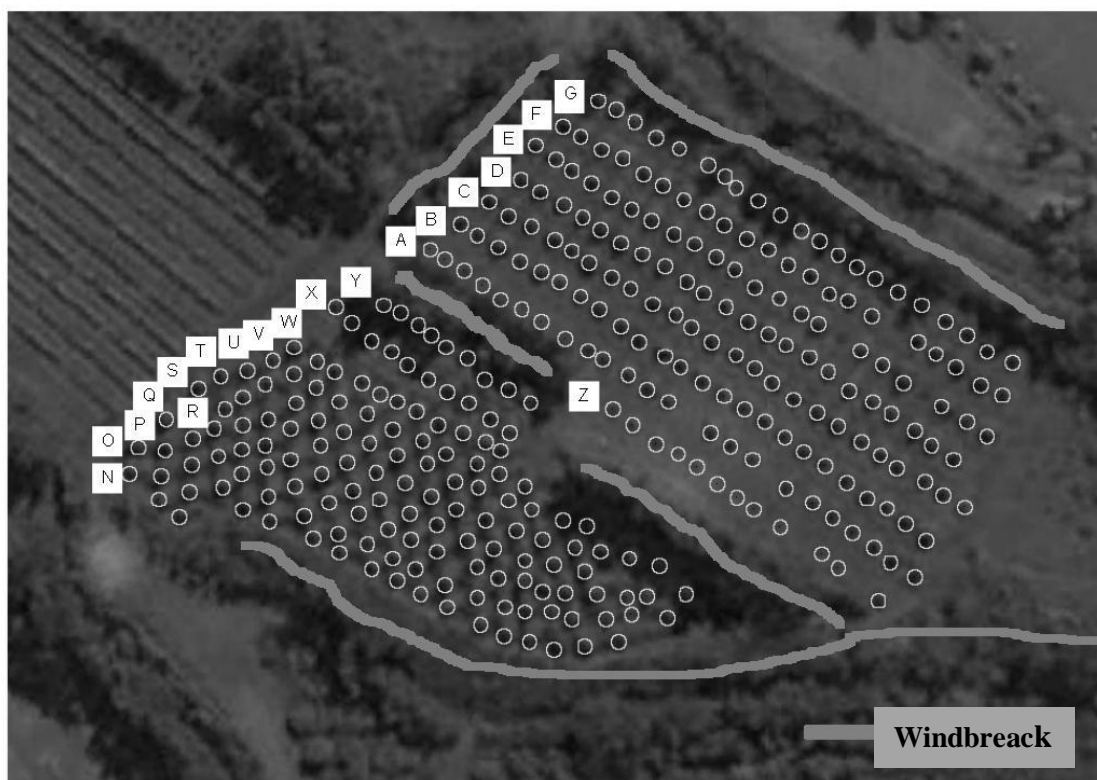
### **1) Experimental design**

#### **a) Location and design**

The experiment was conducted in an orchard planted in 2000 with the cultivar Cogshall at the Center of Production and Agricultural Research at Saint-Paul (CPEA: 20° 58' S lat., 55° 18' E long., 130 m a.s.l.). The distance between trees was 4 m within the row and 6 m between rows. The nearest mango trees were located about 200 m from this orchard. Mango orchards occupied less than 4% of the area within a radius of 1 km. The orchard was divided into two plots by a windbreak (Figure 1). The ground of the first plot, hereafter referred to as covered plot, was completely covered with tarpaulins from the beginning of the winter to the end of the survey in order to avoid the emergence of native adult gall midges. This plot had a rectangular shape measuring approximately 50 m by 100 m (0.5 ha). It was composed of 168 trees distributed in 8 rows (one with 12 trees and the others with 21 to 24 trees). Each tree of the covered plot was divided in two parts, hereafter referred to as half-trees, one on each side of the row. The ground of the second plot, hereafter referred to as control plot, was not covered. This plot measured 0.30 ha and was composed of 143 mango trees distributed in 12 rows with 3 to 19 trees.

The covered plot was described in a 2D orthonormal frame, i.e. a (x,y) reference system. The true coordinates of each tree were determined in this frame. The coordinates of each half-tree were also determined. They were located perpendicularly to the row, at a distance of the radius of the tree canopy from the trunk. We assumed to gather together the mango resources, i.e. inflorescences and young leaves, of each half-tree at its coordinates.





Chap. V - Figure 1: *The experimental orchard divided in two plots by a windbreak. The covered plot is in the upper part of the picture and the control plot is in the lower part of the picture. The grey circles indicate mango trees.*

#### b) Phenological survey of mango trees

Inflorescence development was divided into five successive phenological stages (Dambreville 2012). The stage *D* corresponds to the end of bud burst and the beginning of the main axis elongation. The stage *E* corresponds to the elongation of the inflorescences, without open flower. The stage *F1* corresponds to the first half of the flowering, when up to 50% of the flowers are open. The stage *F2* corresponds to the second half of the flowering, when more than 50% of the flowers are open. The stage *G* corresponds to the end of flowering, with no open flowers and the beginning of development of small green fruits.

Each week, the new inflorescences at the stage *D* and the new growth units (bearing the young leaves susceptible to *P. mangiferae*) were counted on each half-tree. The resources (inflorescences or young leaves) dead before their complete development (stage *G* for inflorescences) were counted. The phenological composition of each half-tree was evaluated from these counts by applying a fixed duration to each phenological stage, and by removing the dead resources. The duration of each of the phenological stages *D*, *E* and *G* for inflorescences was 7 days. The duration of each of the phenological stages *F1* and *F2* was 14 days. The duration of the young leaves on new growth units was 14 days.



### c) Larval population survey

On the covered plot, third instar larvae falling from mango resources were captured by traps placed on the ground. The trap was a box with a horizontal opening of 180 cm<sup>2</sup>, filled with water to impede predation by ants and larva escape by jumping. One trap was installed under each half-tree, from the appearance of the first susceptible resources on this half-tree. The trap remained under the resources as long as it was susceptible to *P. mangiferae*. It was then moved under the youngest susceptible resources on the half-tree. At each date, on the control plot, the larval population was estimated at each date using the traps described in Amouroux et al. (2013). Twenty traps were installed under different trees.

Twice a week, the numbers of larvae fallen in the traps were recorded on each plot. The number, type, and phenological stage of the resources above each trap were also recorded in both plots. Traps without water or bend back were not included in the data.

### 2) Model description

As we modelled the result of the females arrival in a non-contaminated orchard, i.e. the number of larvae produced in inflorescences and young leaves, four main steps were be modelled: the arrival of females in the orchard, the displacement to the resource within the orchard, the egg-laying and larval development, and the interception of the larvae by the trap.

#### a) Females arrival in the orchard

Because of the small size of *P. mangiferae* and their a priori low flight capacity, we assumed that the arrival of gall midge females in an orchard needs a medium- to long-distance flight and is a passive process, driven by environmental factors such as the wind. We assumed that the  $n$  female landing points are positioned in a regular grid of 2 m mesh covering the whole area of the covered plot. The landing in the orchard can be uniform, or driven to a certain extent by the resources, involving a kind of oriented flight just before landing. We developed two models of female arrival in the orchard, one for each of these two processes. In both models, we assumed that there is no interaction between females landing in the orchard, and that the number of females landing in the orchard at the date  $t$  is time-dependent and follows a Poisson distribution with parameter  $\lambda_t$ .

In the first model, hereafter referred to as Model 1, the landing in the orchard is followed a uniform distribution. For each date, the probability for a female to land at the point  $\pi$  is:

$$P_1(\pi, t) = \frac{1}{n} \quad (\text{Eq 1})$$

In the second model, hereafter referred to as Model 2, the landing is driven by resources, mango inflorescences or young leaves, which can be scattered quantitatively (number of resources) and qualitatively (different phenological stages) in the orchard at the date  $t$  because of mango phenological asynchronisms. The resource orientates the last part of the flight, but females do not necessarily land on the resource. We assumed that the attractiveness of mango resources located at the point  $\pi_i$  at the date  $t$  depends on the number  $N_{i,t}$  of mango resources at this point, which determines the intensity of the attractiveness, and on the distance  $d_i$  to this point, which determines

the range of the attractiveness. The attractiveness is maximal at the point  $\pi_i$  and decreases with the distance  $d_i$  according to a 2D Gaussian kernel defined as:

$$G_{2D}(d, \sigma) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{\frac{-d_i^2}{2\sigma^2}} \quad (\text{Eq 2})$$

$\sigma$  being the width of the Gaussian kernel (equivalent of the standard deviation of the Gaussian probability density function).

The attractiveness at any point  $\pi$  of the orchard  $A(\pi, t)$  is then defined as the sum of the attractiveness of all the mango resources of the orchard located at the points  $\pi_i$ , at a distance  $d_{(\pi-\pi_i)}$ :

$$A(\pi, t) = \sum_i N_{i,t} \cdot g(d_{(\pi-\pi_i)}, \sigma_R) \quad (\text{Eq 3})$$

where  $g$  is a 2D Gaussian kernel of width  $\sigma_R$ .

We assumed that the last part of the female arrival flight is driven by the attractiveness of the resources at each point relative to the attractiveness of all the resources at any point of the orchard at this date. The orchard is then considered as an uneven field of landing probability shaped by the local resources, and not as a uniform field of landing probability as in the Model 1. Then the probability for a female to land at the point  $\pi$  is:

$$P_2(\pi, t) = \frac{\sum_i N_{i,t} \cdot g(d_{(\pi-\pi_i)}, \sigma_R)}{\sum_{\pi} \sum_i N_{i,t} \cdot g(d_{(\pi-\pi_i)}, \sigma_R)} \quad i \in \{1, n\} \quad (\text{Eq 4})$$

And the number of female gall midges landing in the orchard at the date  $t$  at the point follows a Poisson distribution whose parameter is  $\lambda_t P_r(\pi, t)$  with  $r \in \{1, 2\}$

#### b) Trivial flight

In the orchard, mango trees ensure a quiet and less perturbed air, allowing the female trivial flight. We supposed that the female could detect each surrounding mango resource and could move actively to the most attractive. We supposed that the attractiveness  $\alpha_{S(j,t)}$  of a mango resource  $j$  located at the point  $\pi_j$  for a female located at the landing point  $\pi$  depends on the type of resource and its phenological stage  $S$  at the date  $t$  for the inflorescences and on its distance to the point  $\pi$ . We assumed that the attractiveness of inflorescences and young leaves are different. All the phenological stages of inflorescences are susceptible to *P. mangiferae* (Amouroux and Normand, 2010), and we assumed that the attractiveness of an inflorescence changes during its development, i.e differs among the inflorescence phenological stages, and that the attractiveness of a given phenological stage is constant, i.e. is not time-dependent. By contrast, young leaves are susceptible to *P. mangiferae* during a particular and short (14 days) phenological stage and we do not consider changes in the attractiveness of young leaves. As for the passive flight, the distance effect is modelled by a 2D Gaussian kernel (Eq. 2) of constant width  $\sigma_A$  centred on the mango resource  $j$ . As several resources might be available for a given female, the attractiveness of each resource for this female is scaled to the attractiveness of all the resources available in the orchard.

Consequently, the probability that a female landed at the point  $\pi$  flies actively to the mango resource  $j$  located at the position  $\pi_j$  at the distance  $d_{(\pi-\pi_j)}$  is:

$$P(\pi, j, t) = \frac{\alpha_{S(j,t)} h(d_{(\pi-\pi_j)}, \sigma_A)}{\sum_{j \in K} \alpha_{S(j,t)} h(d_{(\pi-\pi_j)}, \sigma_A)} \quad (\text{Eq 5})$$

where  $h$  represents a 2D Gaussian kernel of width  $\sigma_A$ , and  $j \in K$  represents all the mango resources of the orchard at the date  $t$ .

Assuming the independence of female behaviour, the number of females landed in the orchard at the date  $t$  and reaching the mango resource  $j$  whose attractiveness is  $\alpha_{S(j,t)}$  follows a Poisson distribution whose parameter is:

$$\omega_{(j,t)} = \lambda_t \sum_{\pi} P(\pi, j, t) P_r(\pi) \quad (\text{Eq 6})$$

where  $P_r(\pi)$ ,  $r \in \{1, 2\}$ , is defined according to the arrival model chosen (Equation 1 or 4).

#### c) Egg laying and larval development

We supposed that a female lays all its eggs on the first resource it reaches, and that the number of eggs laid by a female follows a Poisson distribution of parameter  $E$ . Each egg develops into a third instar larva with a survival probability  $\mu$ . We supposed that the duration  $\delta$  between egg laying and the third larval instar ready to leave the resource is constant, independent of temperature and of possible competition between larvae developing in the same resource. We supposed that egg laying and survival probability are independent (i) of the type of mango resource, (ii) of the phenological stage (for inflorescences), (iii) of the number of eggs previously laid on the resource, and (iv) of the number of larvae developing in the resource. In other words, there is no interaction between females in their egg laying behaviour, and between larvae in their development, and the parameters  $E$  and  $\mu$  are constant. The number of larvae produced by a mango resource at the date  $t+\delta$  is the sum of the  $l_1, l_2, \dots, l_\omega$  larvae developed from the eggs laid by the females  $1, 2, \dots, \omega$  that arrived on the resource at the date  $t$ . The number  $\omega_{(j,t)}$  of females arriving on the resource  $j$  at the date  $t$  follows a Poisson distribution (Equation 6). The number of larvae produced by a given female also follows a Poisson distribution of parameter  $E\mu$ . Consequently, the number of third instar larvae falling from the resource  $j$  at the date  $t+\delta$  follows a Compound Poisson distribution with parameters  $\omega_{(j,t)}$  (Eq 6) and  $E\mu$ .

#### d) Number of larvae captured in a trap

The number of larvae captured in a trap is the sum of all the larvae falling from the mango resources located above this trap and intercepted by the trap. The trap has a constant size, but the size of the mango resources above the trap, and consequently the efficiency of the trap to intercept falling larvae, depends on the type of resource and of its stage of development. For the same reasons than for resource attractiveness for the active flight, we assigned a parameter of trap efficiency  $\beta_{S(j,t+\delta)}$  to each phenological stage  $S_{(j,t+\delta)}$  for the inflorescences at the date  $t+\delta$ , and one for the young leaves. This parameter reflects the ability for a trap to capture the larvae from this

resource or phenological stage located above the trap. Then the number of third instar larvae produced by a given female and captured by a trap at  $t+\delta$  follows a Poisson distribution with parameter  $E\mu\beta_{S(j,t+\delta)}$ .

Let  $b$  be a trap in the orchard at the date  $t+\delta$  and  $K_b$  the mango resources above the trap  $b$ . The number of larvae captured in the trap at  $t+\delta$  is the sum of the larvae coming from each resource belonging to  $K_b$ . Then, the distribution of the number of larvae  $L_{(b,t+\delta)}$  found in the trap  $b$  at the date  $t+\delta$  is the convolution of  $K_b$  Poisson distributions with parameters  $\omega_{(j,t)}$  (Eq 6) and  $E\mu\beta_{S(j,t+\delta)}$ ,  $j \in K_b$ .

The parameters of the models (Model 1 and Model 2) are summarized in Table 1.

Chap. V - Table 1: Summary of subscripts, variables of the model, state variables and estimated parameters used in the model description.

	Description	Value
<b><u>Indices</u></b>		
t	date	1 to 29
r	hypothesis of passive flight	1 (uniform landing) or 2 (landing driven by resources)
j	a mango resource	1 to K (all the mango resources of the orchard at the date t)
b	trap	1 to number of traps in the orchard at the date t
S	phenological stage of mango resource	D, E, F1, F2, G for inflorescences and Veg for young leaves
i	landing point	1 to n
<b><u>Variables of the model</u></b>		
N	number of mango resources	
L	number of larvae intercepted by a trap	
<b><u>Fixed parameters</u></b>		
d	distance	
$\pi$	coordinates (x,y) of landing points	
$\delta$	developmental time from egg to third instar larva	7 days
$\omega$	number of females arrived on the resource	
E	number of eggs laid by an individual female	
n	number of landing points	1140
<b><u>Estimated Parameters</u></b>		
$\lambda_t$	number of females incoming in the orchard at the date t	
$\alpha_S$	attractiveness of the phenological stage S	
$\beta_S$	trap efficiency under the phenological stage S	
$\mu$	survival probability from egg to third instar larvae	
$\sigma_R$	variance of the 2D Gaussian kernel of mango resource attractiveness before passive flight	
$\sigma_A$	variance of the 2D Gaussian kernel of mango resource attractiveness for active flight	

### 3) Parameters estimation

To limit the number of parameter, we imposed the following constraints:  $\alpha_E=1$  and  $\beta_E=1$ . i.e. organ attractiveness and trap efficiencies were estimated relatively to those of inflorescences at stage  $E$ . We fixed the mean number of eggs laid by a female at  $E=100$  eggs (Prasad 1971). We estimated as a whole the parameter of the Poisson distribution  $E\mu\beta_E$ , i.e the product of the survival and the number of eggs laid for the trap efficiency of the inflorescence  $E$ . The records of larvae fallen in the traps were realised twice a week, every 3 or 4 days, and parameters were estimated considering the total number of larvae fallen into each trap between two records, corresponding to the total number of females arrived in the orchard during the same period  $\delta$  days before.

### 4) Model selection and validation

The two models were compared with the Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1998) and the likelihood ratio test.

The AIC deals with the trade-off between the complexity of the model (number of parameters) and the goodness of fit of the model. It is defined as:

$$AIC = -2 \log(\mathcal{L}) + 2p \quad (\text{Eq. 7})$$

where  $p$  is the number of parameters of the model, and  $\mathcal{L}$  is the maximized value of the likelihood function for the estimated model. The smaller is the value of AIC, the better is the goodness of fit.

The likelihood ratio test is used to compare the fit of the two models, with respect to their respective number of parameters. The difference

$$D = -2 \log(\mathcal{L}(\text{Model1})) + 2 \log(\mathcal{L}(\text{Model2})) \quad (\text{Eq. 8})$$

where  $\mathcal{L}$  is the maximized value of the likelihood function for each estimated model follows a chi-squared distribution whose degree of freedom is the difference between the number of free parameters of the models 2 and 1.

However, our models did not fit completely the hypotheses required to use these statistics: (i) dependence is induced by the dispersal functions; (ii) the probability distributions were different between the two models; and (iii) the likelihood was not standard. Moreover, the likelihood ratio test requires nested models, which is not the case for models 1 and 2. Consequently, the result of these tests was just informative.

For these reasons and since the models are stochastic and give different results after each simulation, Monte Carlo procedures (Hope 1968) were preferred to compare and validate the models. One thousand data sets were simulated using the parameters estimated from the

observed data and the phenological pattern of the mango resources in the orchard at each date. Each simulation gave the number of larvae fallen in each trap at each date. Therefore, the 1000 simulations gave a distribution of 1000 numbers of larvae fallen in each trap at each date. The median of these numbers was calculated, as well as the 0.025 and 0.975 quantiles which determined the 95% confidence interval of the simulated data. The observed data were compared to these simulated data.

Two levels of model validation were considered. The first one was at the level of the date, by aggregating the numbers of larvae fallen in each trap for each date. This level of validation considered only the temporal dimension of the female arrival. The total number of larvae counted per date was compared to the simulated data by linear regression. The second level of validation was at the trap level. It considered explicitly the temporal and spatial dimensions of the female arrival, i.e. determined by the availability and location of the resources in the orchard. The number of larvae counted per trap was compared to the simulated data at each date. Semivariograms were performed to test the spatial autocorrelation of observed and simulated data. To check whether the traps with misestimated number of larvae were concentrated on some date or on some phenological stage, we calculated the proportion of trap with over and underestimated number of larvae for each date and each phenological stage.

## Results

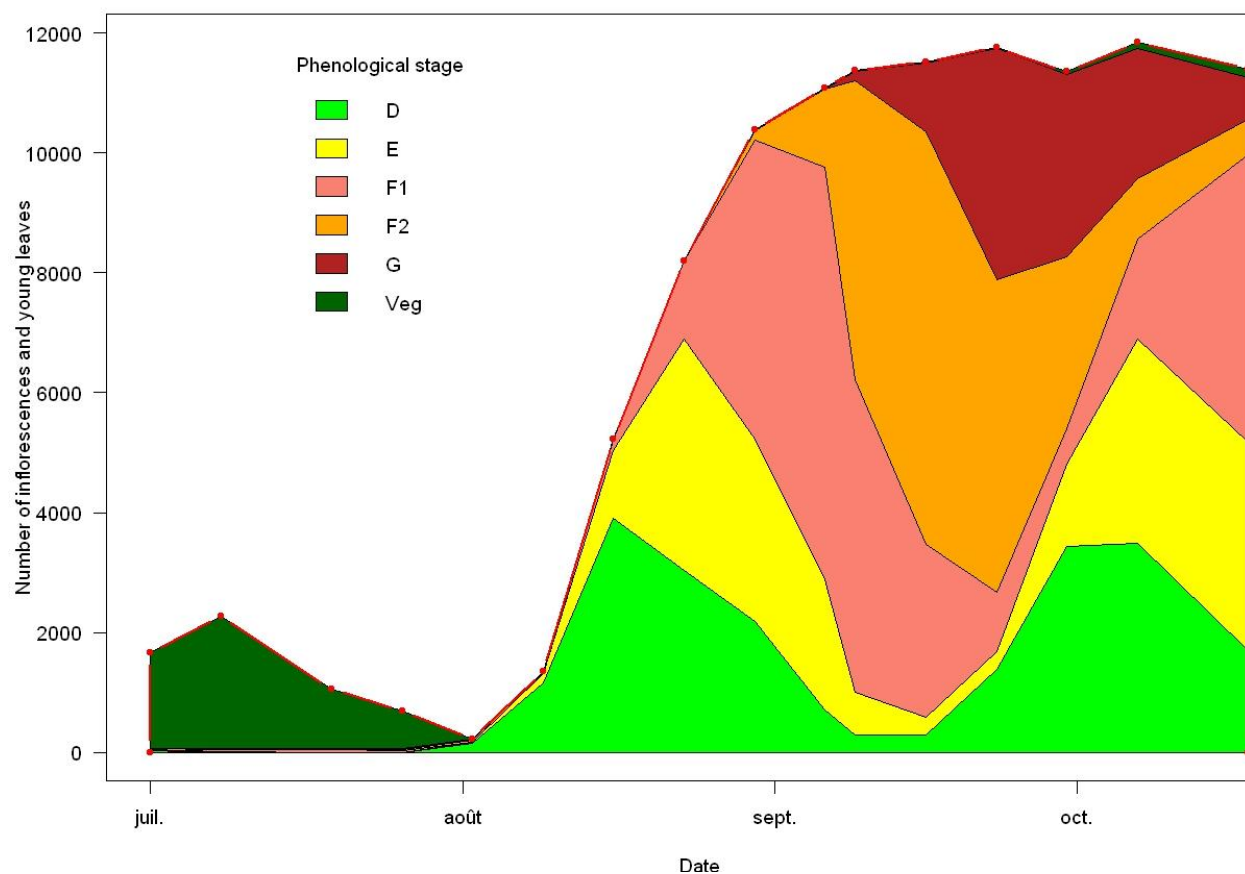
### *Phenology and records of larvae population*

The phenological records in the covered plot showed that resources were present in the orchard during at least four months. The resource was essentially composed of young leaves in July (Figure 2). They were present again, but rare, in the orchard in October. Flowering occurred from the beginning of August to the end of the experiment at the end of October. Two flushes of new inflorescences were observed, the first one in the middle of August and the second one at the beginning of October.

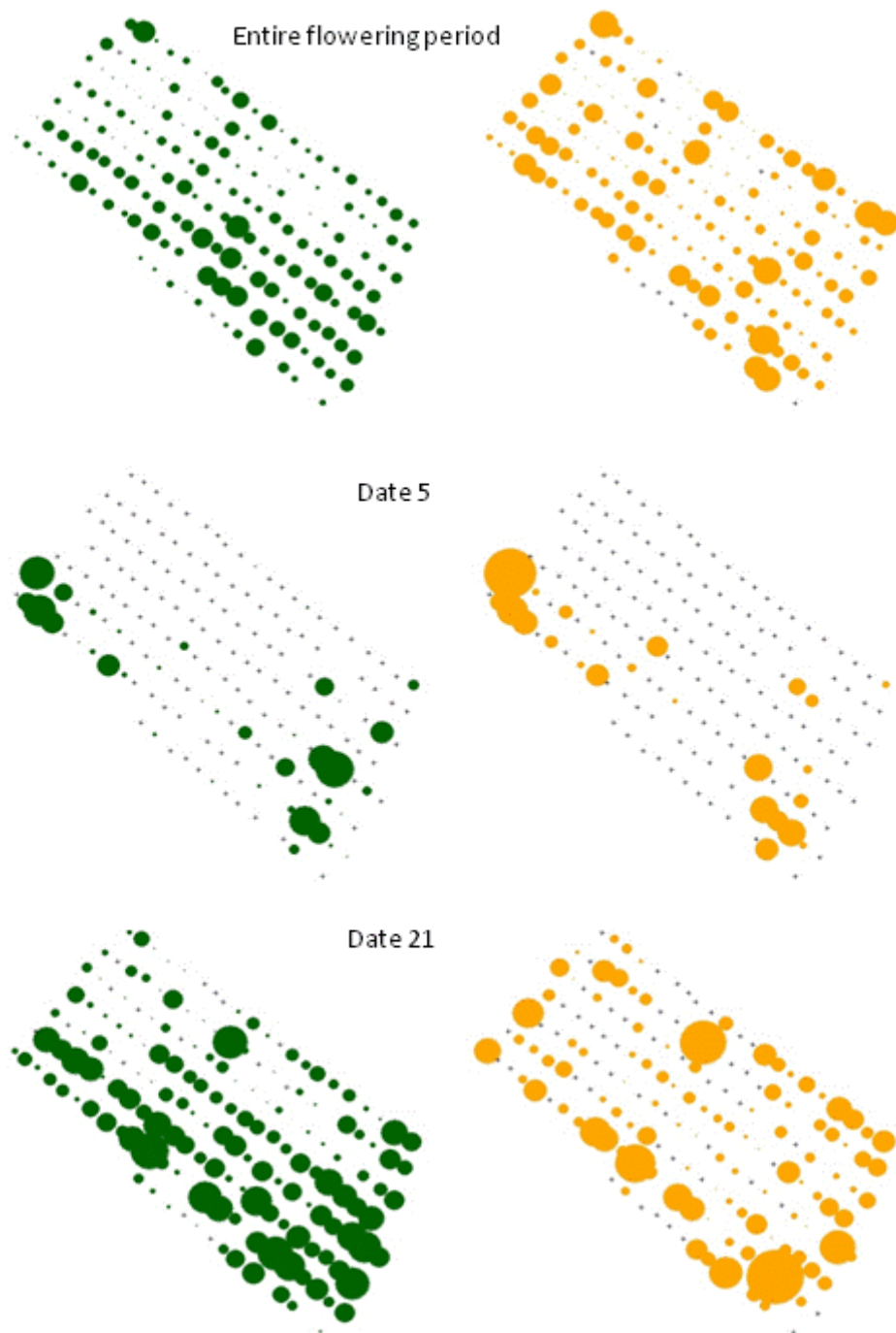
The flowering was however irregular in time and in space in the covered plot (Figure 3). The total number of inflorescences and new young leaves, and the total number of larvae captured in the trap varied between trees in intensity and in spatial repartition in the plot (Figure 3).

At each date with a sufficient number of flowering trees, flowering showed spatial autocorrelations (Figure 4). However, the number of larvae per resource unit, i.e. the number of larvae captured in a trap divided by the number of resources above the trap (variable used to avoid a resource size effect) did not show spatial autocorrelation as denoted by the flat semivariograms.

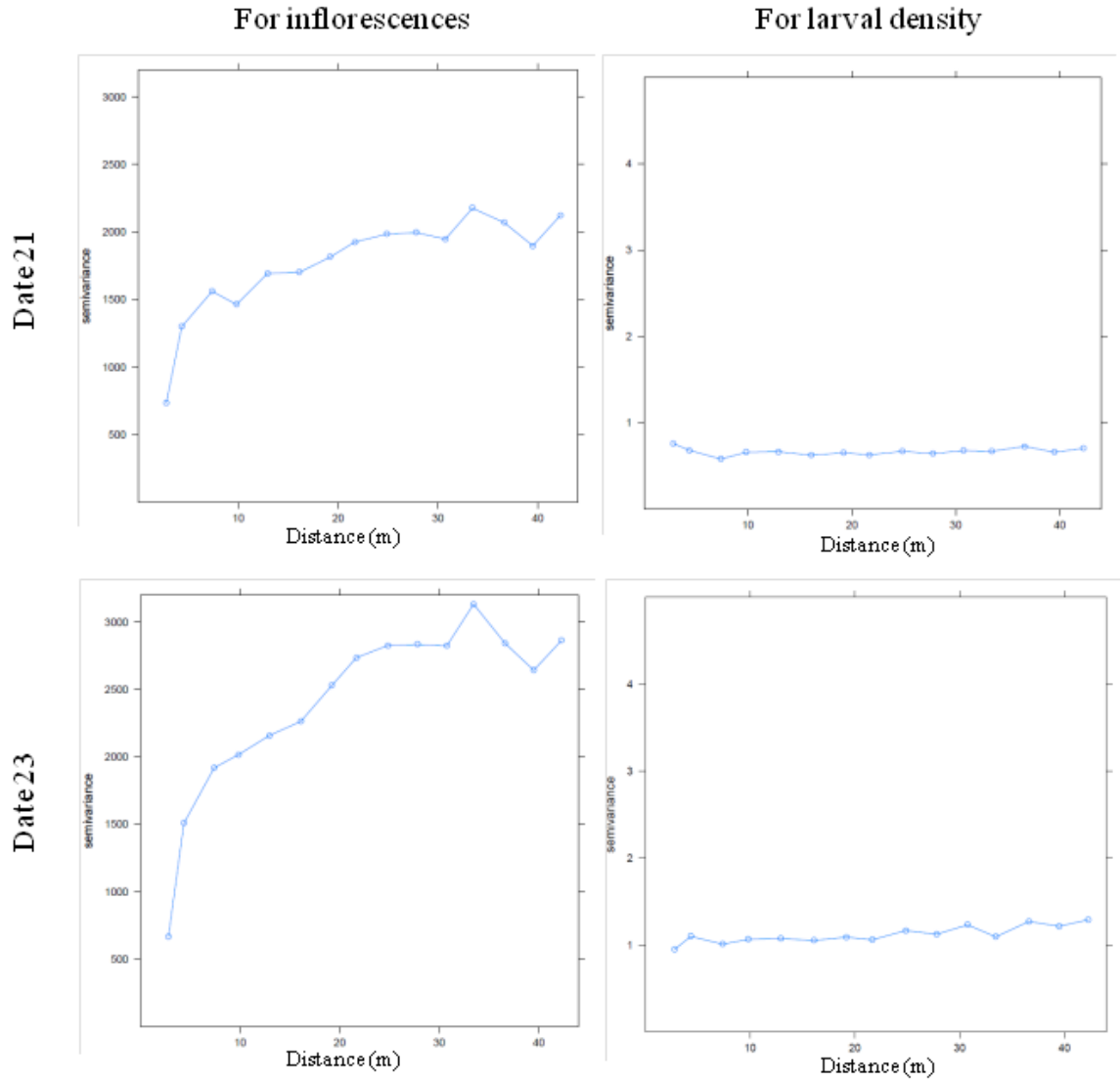




Chap. V - Figure 2: Changes in the number and the phenological stage of the mango resources (inflorescences and young leaves) in the covered plot. The new growth units bearing the young leaves were counted.



Chap. V - Figure 3: Spatial distribution of the number of inflorescences and new growth units per tree (left, green) and of the number of larvae collected per tree (orange, right) during the whole experiment (top), at the beginning of flowering (date 5, middle) and during the peak of flowering (date 21 bottom). For each tree, the diameter is proportional to the number of phenological stage or larvae at each date. Data are the sum of the data of each half-tree.



Chap. V - Figure 4: Semivariograms for the number of inflorescences per tree (left column) and for the density of larvae per resource unit (right column) at the peak of flowering, dates 21 (first line) and 23 (second line). Distance is given on metres.

#### *Parameters estimation*

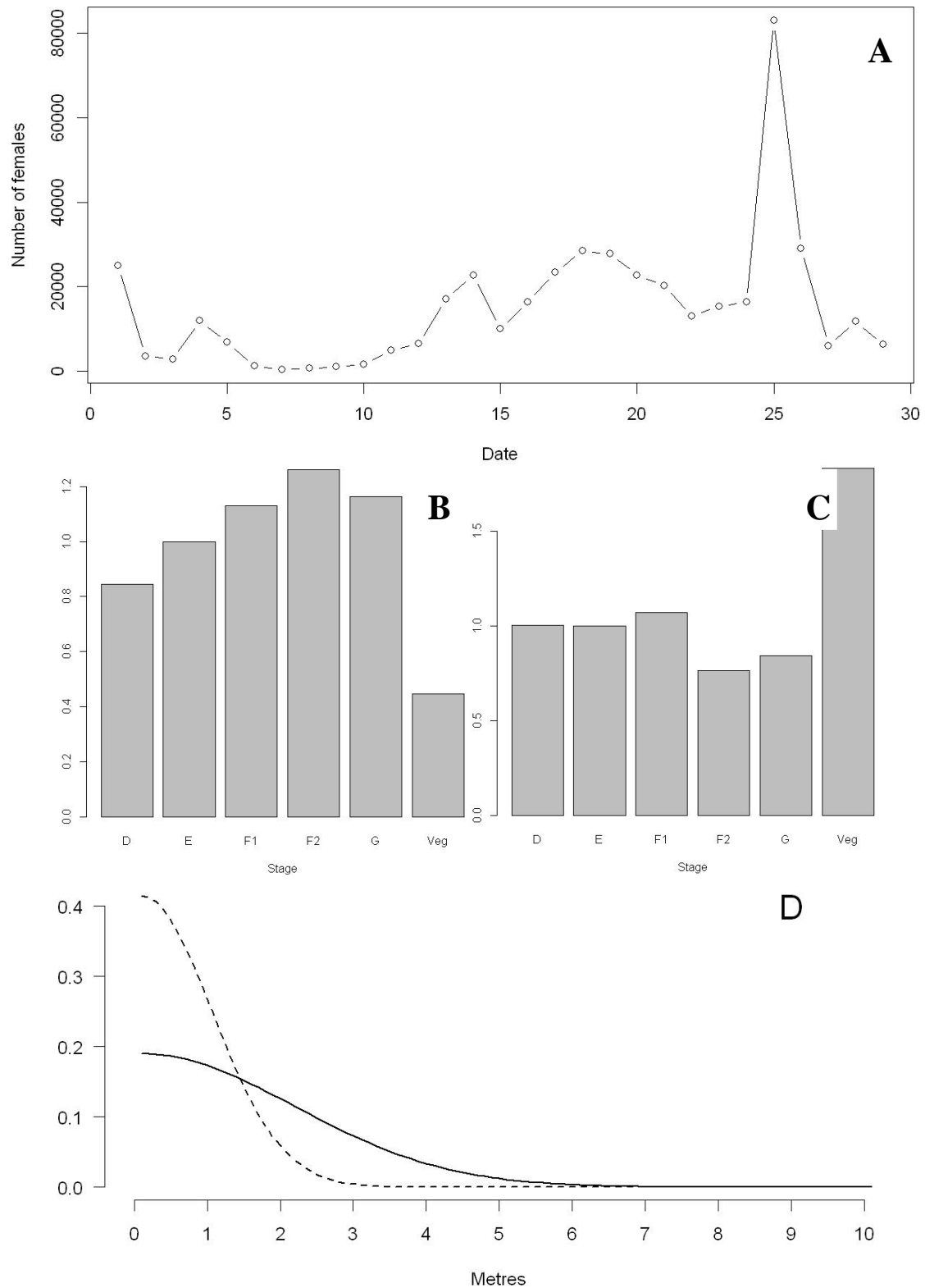
The log-likelihood of Model 1 (uniform arrival of females in the covered plot) was - 20,867 for 41 parameters (Table 2). The number  $\lambda_t$  of females arriving in the plot varied from 333 at the date 7 to 74820 at the date 25. The attractiveness  $\alpha_s$  of mango resources varied across the inflorescence phenological stages from 0.67 (stage *D*) to 1.10 (stage *F1*). It was 0.66 for young leaves. Similarly, the trap efficiency  $\beta_s$  varied across the inflorescence phenological stages from 0.86 (stage *F2*) to 1.09 (stage *D*). It was 1.68 for young leaves. Within three standard deviations  $\sigma_A$ , about 99.7% of the attractiveness of the resource is

described. The width  $\sigma_A$  of the 2D Gaussian kernel was very large. The product of the survival and the number of eggs laid for the trap efficiency of the inflorescence  $E$  was 0.04.

The log-likelihood of Model 2 (female arrival in the covered plot driven by mango resources) was -20563 for 42 parameters (Table 2, Figure 5). The number  $\lambda_t$  of females arriving in the plot varied from 431 at the date 7 to 82936 at the date 25. Daily during the flowering, about 4000 females arrived on average in the covered plot (3 or 4 days between two surveys). The attractiveness  $\alpha_s$  of mango resources varied across inflorescence phenological stages from 0.84 (stage  $D$ ) to 1.26 (stage  $F2$ ). It was 0.45 for young leaves. The trap efficiency  $\beta_s$  varied across inflorescence phenological stages from 0.84 (stage  $F2$ ) to 1.06 (stage  $F1$ ). It was 1.83 for mango leaves. The standard deviation  $\sigma_R$  indicated that the resources could attract the females before landing in a distance of about three metres. The standard deviation  $\sigma_A$  indicated that each resource could attract females in the plot to a distance of about six metres. The product of the survival and the number of eggs laid for the trap efficiency of the inflorescence  $E$  was 0.04 as in Model 1.

Chap. V - Table 2: Model parameters estimated for Model 1 and Model 2 by maximum likelihood method.

	<b>Model 1</b>	<b>Model 2</b>
log-likelihood	-20867	-20563
number of parameters	41	42
$\lambda t$ minimum (date t)	333 (7)	432 (7)
$\lambda t$ maximum (date t)	74820 (25)	82935 (25)
$\lambda t$ mean (29 dates)	13497	15040
$\alpha_D$	0.67	0.84
$\alpha_E$	1.00	1.00
$\alpha_{F1}$	1.10	1.13
$\alpha_{F2}$	0.94	1.26
$\alpha_G$	0.91	1.16
$\alpha_{Veg}$	0.66	0.45
$\beta_D$	1.09	1.00
$\beta_E$	1.00	1.00
$\beta_{F1}$	1.08	1.07
$\beta_{F2}$	0.86	0.76
$\beta_G$	0.92	0.84
$\beta_{Veg}$	1.68	1.83
$\sigma_R$ (metres)	-	0.96
$\sigma_A$ (metres)	55326	2.10
$\mu$	0.04	0.04



Chap. V - Figure 5: Graphical representations of the parameters estimated for the Model 2: (A) number  $\lambda_t$  of females arriving each date in the plot; (B) Differential attractiveness values  $\alpha_s$  of mango resources; (C) Differential trap efficiency values  $\beta_s$  of mango resources; (D) Decrease of the attractiveness of mango resources as a function of distance, represented by the normal distribution with mean 0 (centered on the resource) and standard deviation equal to  $\sigma_A$  (dotted line) and equal to  $\sigma_R$  (solid line). For the graph A, dates range from 2011-07-05 (date 1) to 2011-10-21 (date 29).

### *Model validation*

AIC of the Model 2 (41210) was lower than AIC of the Model 1 (41816). The likelihood ratio test showed that the larger number of parameters of the Model 2 significantly increased its likelihood with respect to the Model 1 ( $\chi^2=608$ ,  $ddl=1$ ,  $P<0.001$ ). These results suggested that the Model 2 was more efficient to fit the data.

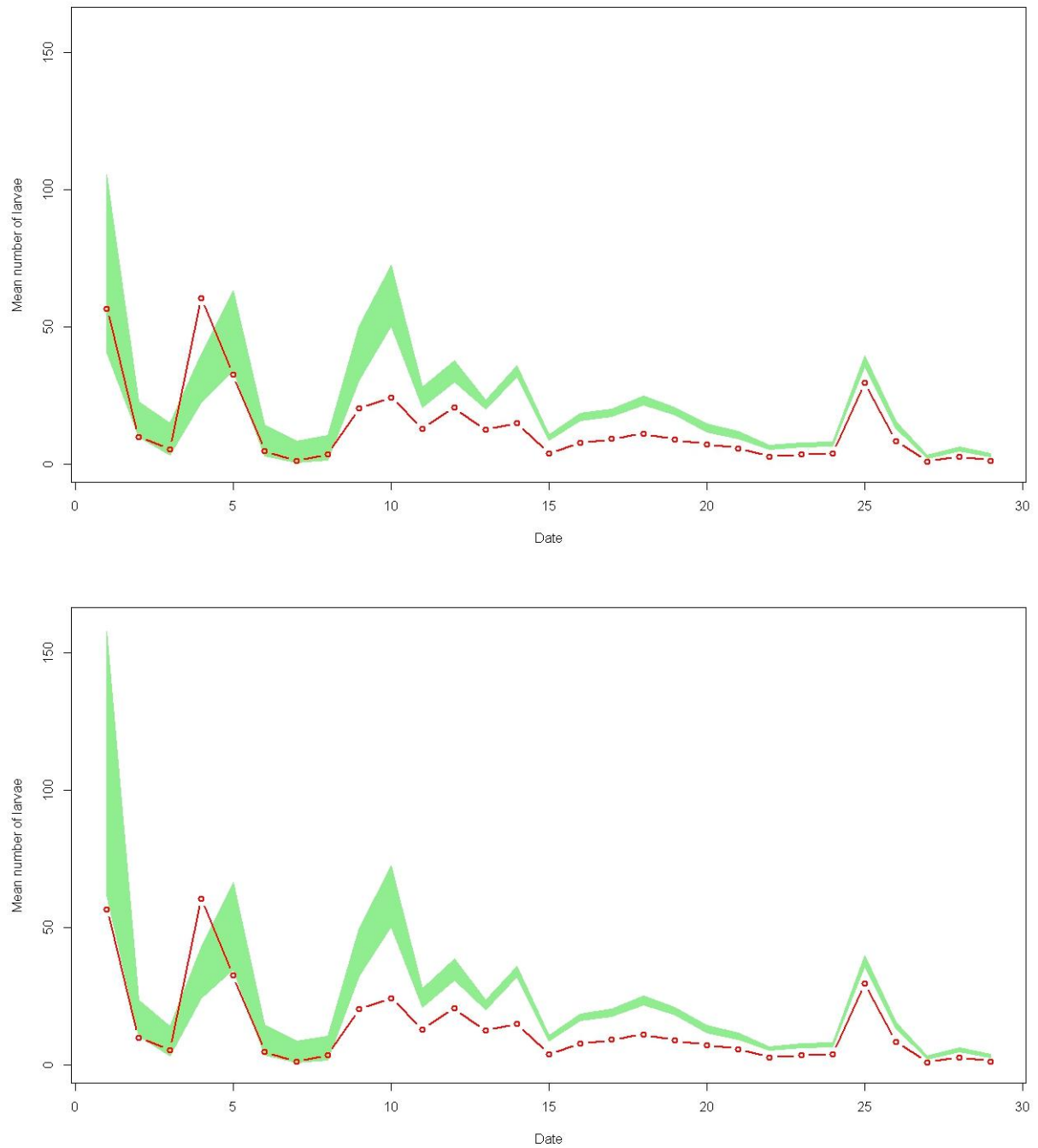
We preferred simulation approaches to compare the validity of each model. First, the temporal dimension was considered by comparing the observed and simulated data sets at date level.

At the date level, the pattern of the number of larvae captured per date was similar for the observed data and the simulated data (Figure 6). However, the two models tended to overestimate the data, in particular from the date 9 to the date 21. For the two models, the observed data were within the 95% confidence interval of the simulated data for five dates which were among the first eight dates (Figure 6).

The overestimation of data by the models was confirmed by observed data vs. simulated data plots (Figure 7, Table 3). The linear adjustments between observed and simulated data were correct ( $r^2$  between 0.64 and 0.69), the slope was not significantly different from 1, but the y-intercepts were positive, significantly different from 0 ( $P<0.05$ ), indicating a regular bias in the simulated data. This bias was on average lower for the Model 2 (lower value of the y-intercept  $b$ , Table 3).

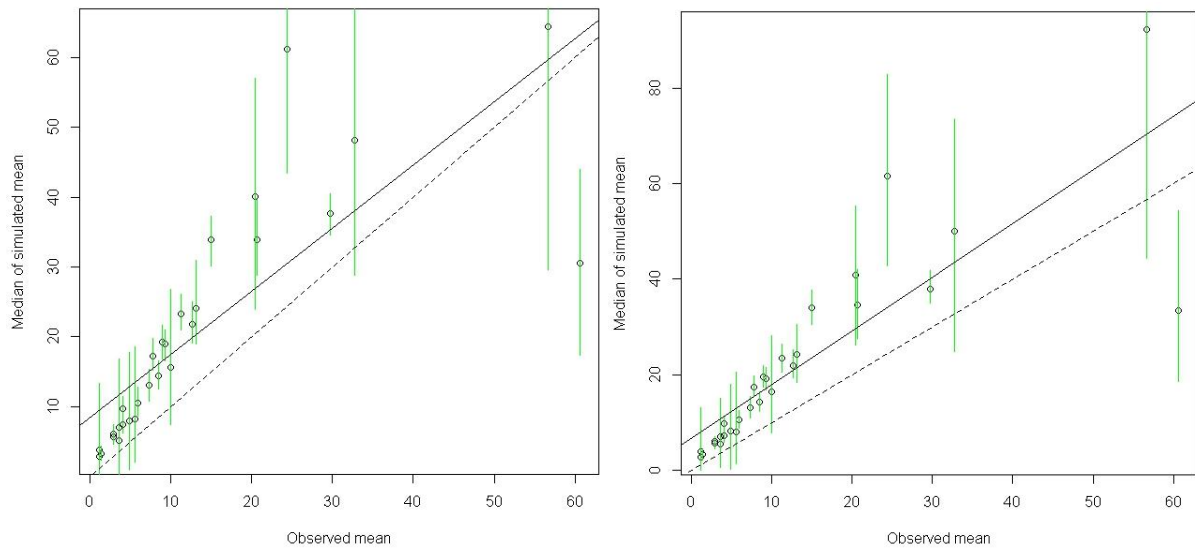
At the trap level, the Model 1 overestimated the number of larvae captured per trap and per date for 11% of the traps, and underestimated it for 6% of the traps. The Model 2 overestimated the number of larvae captured per trap and per day for 12% of the traps, and underestimated it for 6% of the traps. The over and underestimations of number of larvae captured per trap and per day were not related to specific dates or type or phenological stage of the resources as the overestimated data were distributed in 21 out of the 29 dates, and the underestimated data were distributed in 25 out of the 29 dates.

For each date with a sufficient number of traps, the spatial aggregation of the data simulated by the two models was investigated with semivariograms. As for the observed data (Figure 4), the semivariograms were flat, indicating that the simulated number of larvae captured per trap was not spatially autocorrelated (data not shown). Despite the resource was spatially aggregated, the model adequately did not simulate a spatial aggregation of the number of larvae captured per trap.



Chap. V - Figure 6 : Observed mean number of larvae captured per trap and per date (red) and the 95% confidence interval of the simulated data (1000 simulations) (green) for the Model 1 (A) and the Model 2 (B). Dates range from 2011-07-05 (date 1) to 2011-10-21 (date 29).





Chap. V - Figure 7: Regression lines (full line) between the observed mean number of larvae captured per trap and per date and the median of the simulated data with models 1 (left) and 2 (right). Green segments represent the 95% confidence interval of the simulated median. Dotted line:  $y = x$ .

Chap. V - Table 3: Statistics of the linear adjustments between observed and simulated data (mean number of larvae captured per trap and per date) for models 1 and 2.  $a, b$  : slope and y-intercept, respectively, of the linear relationships, standard deviation in brackets, asterisk indicates if the coefficient is different from 0;  $r^2$  : coefficient of determination of the linear relationship. The number of degrees of freedom is given for the residual standard error (RSE) and F in brackets. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

Parameters	Model 1	Model 2
$a$	0.90 (0.13) ***	1.12 (0.14) ***
$b$	8.38 (2.60) **	6.73 (2.86) *
$r^2$	0.64	0.69
RSE (27)	10.37	11.4
F (1,27)	48.23 ***	61.41 ***

## Discussion

### *Phenological survey of mango trees*

The phenological records showed the asynchronism of mango tree growth and flowering at the orchard level during the winter (Figure 3). The flowering was heterogeneous both in space and in time. During the winter, two flowering flushes were observed, extending the presence of susceptible resources. Two to three successive flowering flushes were frequently observed in mango trees (Vincenot & Normand 2009). The resources of *P. mangiferae* were spatially aggregated in the orchard (Figure 4).

*P. mangiferae* was able to colonize the mango resources anywhere in the orchard and whatever the quantity of resources available. During the peak of flowering, when most of the trees were flowering, *P. mangiferae* was present in all the trees and not only on the orchard borders. On the opposite, concentric distribution of gall midge larvae have been observed in large cereal fields (Kolesik 2000; Lampo & Medialdea 1994). The small size of the studied plot (0.5 ha) could explain the rapid colonization of the whole plot by the females. At the beginning of flowering, few mango resources were scattered in the orchard and the females concentrated egg-laying on these resources, leading to the highest mean numbers of larvae captured per trap at these dates.

### *Model selection*

One objective of this study was to test the kind of arrival of females into a new habitat. We tested whether female landing in the orchard was uniformly distributed (Model 1), or was driven by the resources (Model 2). AIC and likelihood ratio test suggested that Model 2 fit the data better than Model 1. The mean number of larvae captured per trap and per date was overestimated by the two models, but the observed data were better predicted, with a fewer bias (Table 3), with the Model 2. The parameters estimated for the two models were close excepted for the value  $\sigma_A$ , the factor of decrease of the resource attractiveness within the orchard. In the Model 1, the value of this parameter was large, more than 100 km, indicating that a resource was still attractive for a female at this distance, which seemed aberrant. At the orchard scale, this meant that wherever a female landed, it was able to detect each resource which did not support decrease of its attractiveness due to the distance. Females could lay eggs anywhere in the covered plot. On the other hand, the value of this parameter for Model 2 indicated that a resource was attractive up to six metres in an orchard, which seemed realistic. The consequence was that a female which landed at more than six metres of the closest resource had only a very low probability to be attracted by this resource, and it probably died without laying eggs.

Consequently, the hypotheses of the Model 2 appeared more meaningful. We retained this model and the hypothesis that the female landing in the orchard was driven by the mango resources. The following discussion is based only on the results of the Model 2.

### *Biological significance of parameters*

The model parameters had a biological significance and the values estimated from the observed data were coherent with this biological significance and with the characteristics of gall midges, which strengthened the value of the model. The number  $\lambda_t$  of females arriving in the orchard was highly variable, from 431 to about 83000 females. At the first date, the number of arriving females was high, about 25000 females. These females could be individuals emerging from diapause and from permanent populations in the neighbour orchard. In this study, we did not address the causes of female dispersal. Emigration could be induced by numerous factors as increasing population density, resource availability, interspecific interactions or patch size (Bowler & Benton 2005). We could hypothesize that at the beginning of flowering, resources were scarce while numerous individuals emerged from diapause because of cool temperatures, suggesting that emigration was caused by resource limitation in the orchard they originated from. However, further experiments should be conducted to investigate the causes of *P. mangiferae* dispersion.

The attractiveness  $\alpha_s$  of mango inflorescences increased regularly from the stage *D* to the stage *F2* and then decreased at stage *G* (Figure 5). This increase could be linked to the inflorescence elongation. A larger inflorescence could emit more attractive compounds than a smaller one. The inflorescences at the stage *G* remained attractive despite the absence of flower buds or young and soft parts. The females probably laid eggs in the ovary of the latest open flowers or in the young developing fruits (Prasad 1971). On the opposite, the attractiveness of young leaves was the lowest. They are susceptible to *P. mangiferae* from the budburst to the beginning of the growth unit axis elongation (Amouroux & Normand 2010).

The parameter  $E\mu\beta_s$  of the Poisson distribution was estimated as a whole because the three parameters appeared as a product. Consequently, they were closely linked could not be individually estimated. According to our assumptions, the mean number of eggs laid per female was fixed at  $E=100$  and the trap efficiency for the inflorescences at the stage *E* was fixed at  $\beta_E=1$ . Then the survival probability was estimated as  $\mu=0.04$ . The trap efficiency  $\beta_s$  for each phenological stage was then calculated from the estimated product  $E\mu\beta_s$  with  $E\mu=4$ . The estimated values of trap efficiency were similar for the phenological stages *D* to *F1* of the inflorescences and then decreased slightly for the stages *F2* and *G* (Figure 5), likely in relation to inflorescence size and position. During the inflorescence elongation from stage *D* to *F1*, its size increased and its inclination moved from the vertical position to the horizontal position. The inflorescence length remained close to the trap length and the galls were mainly located on the inflorescence main axis. This could explain the constant trap efficiency for these three stages. During the stage *F2* and *G*, the inflorescences were horizontal, their secondary axes were completely developed and the galls were mainly located on these axes. The traps were consequently too small to cover the area of larvae fall, and their efficiency was

reduced. The efficiency of traps located under new growth units bearing young leaves was maximal because of the small size of this resource and its vertical position, ensuring that most of the larvae falling from this resource were captured by the trap. This was adequately simulated by the model, as estimate of the trap efficiency for young leaves ( $\beta_{veg}$ ) was around twice-fold the trap efficiency estimated for inflorescences.

In the same way, the survival probability  $\mu$  was estimated on the basis of fixed values given to the mean number  $E$  of eggs laid per female ( $E=100$ ) and for the trap efficiency for inflorescence at the phenological stage  $E$  fixed at  $\beta_E=1$ . Then, the survival probability was low, 0.04. For *M. destructor*, survival during the egg, larval and pupal stages varied from 20% to 70% in function of the egg clutch size (Withers et al. 1997b). Further specific experiments should be performed on *P. mangiferae* to assess key parameters of the biological cycle such as number of eggs laid by each female, and survival probability during the egg and larval development.

The factor of spatial decrease of the resource attractiveness before landing ( $\sigma_R$ ), based on the number of local resources, implied that females were attracted by resources in a radius of about three metres. In the other hand, the factor of spatial decrease of the resource attractiveness after landing ( $\sigma_A$ ) implied that each resource was attractive up to six metres. Our hypotheses and these results suggested that during their arrival females could not orientate precisely their flight and were attracted just before landing, i.e. in a radius up to three metres, by the concentration of resources. After landing, females were in a more quiet air due to mango trees. The attractiveness of individual resources, based on their type and phenological stage, was effective on a larger distance, up to six metres. This suggested that females were able to perform a trivial flight of at least six metres to reach an attractive resource. This range of attractiveness appears congruent with the trivial flight of at least two other Cecidomyiidae species. The lentil gall midge females lay eggs in a radius of approximately 1.8 m around their landing point within a homogeneous and continuous habitat (Kolesik 2000). Females of *M. destructor* lay eggs in wheat at a distance up to 27.5 m of their release point in a patchy habitat (Withers et al. 1997a).

### *Model improvements*

Although the model seemed to be biologically meaningful, it relied on several simplifying hypotheses. The model could be improved by removing some hypotheses in order to account more closely with the supposed biological reality, but it could make the model significantly more complex. For example, we assumed that females laid all their eggs on one single resource. However, female gall midges distribute their eggs on different resources, taking account several factors. For example, egg-laying by *M. destructor* is influenced by the climatic conditions or the presence of eggs previously laid. Females lay more eggs per

resource when wind velocity is higher (Withers & Harris 1997). We also assumed that there was no interaction between females in their egg laying behaviour. However, extrinsic (temperature, host abundance, host quality) and intrinsic (age, egg size and number) factors are known to influence oviposition behaviour (Gibbs & Dyck 2009). To include these behaviours, deposition of eggs on different resources as a function of weather or previous density of eggs or larvae on the resource, in the model would make the model more complex. This complexity would appear in the construction of the model, for example the trajectory of each individual or the history of each mango resource should be modelled. It would also appear for the parameter estimation as the non independence of female behaviours would make the likelihood impossible to formulate. Different types of model should then be developed, such as individual-centered models. Some methodological aspects of the model could also be improved. First, the orchard was positioned in a 2D orthonormal frame and the mango resources were located at the coordinates of each half-tree which bore them. Distances between the orchard elements, resources and females, were calculated on this basis, in a 2D plane. The estimated parameter values were affected by this hypothesis, in particular the factors of decrease  $\sigma_A$  and  $\sigma_R$  and the resources attractiveness. The 3D modelling of the mango orchard would allow positioning it in a 3D orthonormal frame. The distances between orchard elements would then be more accurate, as well as the parameters estimation. Second, the temperature could be included in the model as a time variable. The development of inflorescences was calculated with a deterministic method. Recent studies showed the close relationships between mango inflorescence growth and development and temperature (Dambreville *et al.* 2013), opening the way for thermal time models of inflorescence development which could represent more precisely the succession of phenological stages over time. In the same way, the larval development into mango resources could be modelled as a function of temperature. However, the relationships between the rate of blossom gall midge larva development and temperature, which are probably affected by the type of resource, are not known.

## Conclusion and perspectives

This modelling approach was an initial work to understand the characteristics of *P. mangiferae* dispersion in a new orchard and its movement to the resources within the orchard. We showed that (i) each day during the flowering period, about 4000 females arrived on average in the covered plot, (ii) the landing points of females depended on the quantity mango resource surroundings this point in a radius of three meters, (iii) after landing, females detected mango resource up to six meters around it, (iv) the attractiveness of inflorescences increased from the budburst to the end of the flowering, (v) the attractiveness of the young leaves was lower than then attractiveness of inflorescences. Our study gave interesting information about the dispersion of a gall midge in an orchard habitat. It will be useful to develop new IPM strategies: the development of pest control at a large scale would be more

efficient than at the scale of the individual orchard. Cycle duration, mortality and dispersion are the basis to develop predictive population models for *P. mangiferae*. This work brought knowledge on the last point. Further studies are necessary to explain when females emigrate out of their native orchards.

### Acknowledgements

We are grateful to Xavier Desmulier and technicians of the CPEA for making the mango orchard available. We would like to thank to Emilie Serin, Claire Bourgart and Eléonore Bricca for their technical help during the surveys in the orchard and the data entry. We would also like to thank Gilles Maillot and Frédéric Payet for their helpful assistance during plot covering and uncovering. This work was funded by the European Agricultural Fund for Rural Development (EAFRD, Bilan de Santé de la PAC, No 11111D974000019) and by CIRAD.

## V.2. Conclusion du chapitre

Le modèle que nous avons retenu se base sur l'hypothèse selon laquelle les femelles arrivent dans un verger par un vol passif dont le point de chute (l'« atterrissage ») est influencé par la quantité de ressource présente dans un rayon d'environ 6 mètres autour de ce point. Ensuite, les femelles se déplacent activement vers la ressource la plus attractive présente dans un rayon de 8 mètres, qui correspond au rayon au-delà duquel l'attractivité d'une ressource n'est plus « ressentie ». L'attractivité de la ressource dépend de son type (inflorescence ou jeune feuille) et du stade phénologique pour les inflorescences. Un autre résultat important est que le nombre de femelles arrivant dans le verger suivi (0,5 ha) est de l'ordre de 4 000 individus par jour mais varie fortement au cours de la saison.

Plusieurs analyses du modèle doivent encore être conduites, notamment pour confirmer nos hypothèses : l'attractivité des inflorescences dépend de leur stade phénologique, l'efficacité des pièges varie en fonction du type et du stade phénologique de la ressource. Par exemple, des modèles nuls (un seul paramètre pour l'attractivité de la ressource ou l'efficacité des pièges) seront construits et comparés au modèle complet qui a été présenté. On aura alors des modèles emboîtés qui permettront d'utiliser l'AIC et des tests de rapport de vraisemblance pour les comparer. La variabilité des paramètres sera aussi calculée par bootstrap en utilisant les jeux de données simulées.

L'estimation des paramètres a été réalisée sur le jeu de données obtenu en 2011. La validation des modèles reste à effectuer sur les données collectées pendant la floraison de 2010 et celle de 2012.

## Références bibliographiques

- Aak A, Knudsen GK, Soleng A (2010) Wind tunnel behavioural response and field trapping of the blowfly *Calliphora vicina*. *Medical and Veterinary Entomology* **24**, 250-257.
- Akaike H (1998) Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: *Selected Papers of Hirotugu Akaike* (eds. Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G), pp. 199-213. Springer New York.
- Amouroux P, Normand F (2010) Survey of mango pests on Réunion Island, with a focus on pests affecting flowering. In: *9th International Mango Symposium*, p. 24, Sanya, China.
- Amouroux P, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2013) Invasive mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations. *Biological Invasions* **15** (8):1677-1693.
- Barbosa FR (2005) Manejo integrado de pragas da mangueira. *Annals of the I Simposio de Mango do vale do Sao Francisco*, 1 - 38.
- Bowler DE, Benton TG (2005) Causes and consequences of animal dispersal strategies: relating individual behaviour to spatial dynamics. *Biological Reviews* **80**, 205-225.
- Byrne DN, Isaacs R, Veenstra KH (2013) Local Dispersal and Migration by Insect Pests and Their Importance in IPM Strategies. In: *Radcliffe's IPM World Textbook*, URL:



- <http://ipmworld.umn.edu>, (ed. E. B. Radcliffe WDHREC), University of Minnesota, St. Paul, MN.
- CAB I (2004) Crop Protection Compendium. In: 2004. CAB International, Wallingford, UK.
- Dambreville A (2012) *Croissance et développement du manguier (Mangifera indica L.) in natura – Approche expérimentale et modélisation de l'influence d'un facteur exogène, la température, et de facteurs endogènes architecturaux*, Manuscrit de thèse, Université Montpellier II. 185pp.
- Dambreville A, Normand F, Lauri P-É (2013) Plant growth co-ordination in natura: a unique temperature-controlled law among vegetative and reproductive organs in mango. *Functional Plant Biology* **40**, 280-291.
- Davenport TL, Nuñez-Elisea R (2009) Reproductive Physiology. In: *The Mango - Botany, production and uses* (ed. Litz RE), pp. 97-169. CAB International, Wallingford, UK.
- Dingle H, Drake VA (2007) What Is Migration? *Bioscience* **57**, 113-121.
- Dorchin N (2008) Cecidomyiidae (Diptera). In: *Encyclopedia of Entomology* (ed. Capinera JL), pp. 1576-1580. Springer Science, Dordrecht, The Netherlands.
- Etienne J (1977) Notes sur les cécidomyies du manguier à la Réunion (ed. I.R.A.T.). I.R.A.T., Ile de la Réunion, France.
- Gagné RJ (2010) Update for a catalog of the Cecidomyiidae (Diptera) of the world. Digital version 1.
- Gibbs M, Dyck H (2009) Reproductive plasticity, oviposition site selection, and maternal effects in fragmented landscapes. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**, 1-11.
- Grover P (1985) Population Fluctuation of *Erosomyia indica* & *Dasineura amramanjarae* and co-related extend of damage. *Cecidologia indica* **VII**, 43-57.
- Hope A (1968) A Simplified Monte Carlo Significance Test Procedure. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **30**.
- Jensen AB, Palmer KA, Chaline N, *et al.* (2005) Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics* **6**, 527-537.
- Kolesik P (2000) Distribution of infestation by lentil gall midge *Contarinia lentis* (Dipt., Cecidomyiidae) in lentil fields: statistical model. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift fur Angewandte Entomologie* **124**, 7-10.
- Lampo M, Medialdea V (1994) Dispersal Pattern of the Sorghum Midge (Diptera: Cecidomyiidae) in Sorghum Plots. *Environmental Entomology* **23**, 551-555.
- Loxdale HD, Lushai G (2001) Use of genetic diversity in movement studies of flying insects. In: *Insect Movement: Mechanisms and Consequences* (ed. Woiwod IP, Reynolds, D.R., Thomas, C.D.), pp. 361-386. CAB International, Wallingford, UK.
- Meats A, Smallridge CJ (2007) Short- and long-range dispersal of medfly, *Ceratitis capitata* (Dipt., Tephritidae), and its invasive potential. *Journal of Applied Entomology* **131**, 518-523.
- Miao J, Wu YQ, Gong ZJ, *et al.* (2013) Long-Distance Wind-Borne Dispersal of *Sitodiplosis mosellana* Gehin (Diptera: Cecidomyiidae) in Northern China. *Journal of Insect Behavior* **26**, 120-129.
- Olfert O, Elliot RH, Hartley S (2009) Non-native insects in agriculture: strategies to manage the economic and environmental impact of wheat midge, *Sitodiplosis mosellana*, in Saskatchewan. *Biological Invasions* **11**, 127-133.

- Peña JE, Mohyuddin AI, Wysoki M (1998) A review of the pest management situation in mango agroecosystems. *Phytoparasitica* **26**, 129-148.
- Pezhman H, Askari M (2004) A study on the biology of mango inflorescence midge in Hormozgan province. *Applied Entomology and Phytopathology* **72**, 19-29.
- Prasad SN (1971) *The Mango Midge Pests* Cecidological Society of India, Allahabad, India. 172pp.
- Raman A (2012) Adaptive radiation and diversification in gall-inducing insects in the Indian subcontinent: search for a pattern. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* **59**, 177-187.
- Reynolds DR, Riley JR (2002) Remote-sensing, telemetric and computer-based technologies for investigating insect movement: a survey of existing and potential techniques. *Computers and Electronics in Agriculture* **35**, 271-307.
- Riley JR, Smith AD (2002) Design considerations for an harmonic radar to investigate the flight of insects at low altitude. *Computers and Electronics in Agriculture* **35**, 151-169.
- Sedda L, Brown HE, Purse BV, *et al.* (2012) A new algorithm quantifies the roles of wind and midge flight activity in the bluetongue epizootic in northwest Europe. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279**, 2354-2362.
- Suni SS, Gordon DM (2010) Fine-scale genetic structure and dispersal distance in the harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*. *Heredity* **104**, 168-173.
- Taylor LR (1974) Insect migration, flight periodicity and the boundary layer. *Journal of Animal Ecology* **43**, 225-238.
- Taylor RAJ, Bauer L, Poland T, Windell K (2010) Flight Performance of *Agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae) on a Flight Mill and in Free Flight. *Journal of Insect Behavior* **23**, 128-148.
- Vinatier F, Tixier P, Duyck P-F, Lescourret F (2011) Factors and mechanisms explaining spatial heterogeneity: a review of methods for insect populations. *Methods in Ecology and Evolution* **2**, 11-22.
- Vinatier F, Lescourret F, Duyck P-F, Tixier P (2012) From IBM to IPM: Using individual-based models to design the spatial arrangement of traps and crops in integrated pest management strategies. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **146**, 52-59.
- Vincenot D, Normand F (2009) *Guide de production intégrée de mangues à la Réunion* CIRAD et Chambre d'Agriculture, Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France. 121 pp.
- Whitwell AC (1993) The pest/predator/parasitoid complex on mango inflorescence in Dominica. *Acta Horticulturae* **341**, 421-432.
- Withers TM, Harris MO (1997) Influence of Wind on Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Flight and Egg-laying Behavior. *Environmental Entomology* **26**, 327-333.
- Withers TM, Harris MO, Madie C (1997a) Dispersal of Mated Female Hessian Flies (Diptera: Cecidomyiidae) in Field Arrays of Host and Nonhost Plants. *Environmental Entomology* **26**, 1247-1257.
- Withers TM, Madie C, Harris MO (1997b) The influence of clutch size on survival and reproductive potential of Hessian fly. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **83** 205 - 212
- Zhou LY, Hoy CW, Miller SA, Nault LR (2003) Marking methods and field experiments to estimate aster leathopper (*Macrostelus quadrilineaus*) dispersal rates. *Environmental Entomology* **32**, 1177-1186.

L'objectif général de la thèse était d'étudier les relations entre la cécidomyie des fleurs du manguier *Procontarinia mangiferae* et sa plante hôte exclusive, le manguier, afin d'améliorer les connaissances sur l'un des principaux bio-agresseurs de cette culture. Mes travaux de recherche ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la diversité génétique de cette espèce, ses stratégies de vie au cours de l'année et les caractéristiques de sa dispersion.

Nous allons discuter des résultats obtenus au cours de la thèse pour expliquer (i) comment une seule espèce peut se maintenir sur deux types de ressource d'une même plante-hôte, (ii) la structure des populations observée à la Réunion, (iii) les stratégies de vie développées en fonction des caractéristiques de l'habitat. Un dernier point traitera des applications pratiques de ces résultats dans le cadre d'une protection agroécologique.

### VI.1. Une seule espèce pour deux types de ressource d'une plante-hôte

Une conclusion remarquable de mes travaux est d'avoir montré qu'il n'y avait pas de différence génétique entre les populations de *P. mangiferae* issues de deux types de ressource : les inflorescences et les jeunes feuilles. A ce facteur « ressource » est associé un facteur temporel puisque les inflorescences apparaissent principalement en hiver tandis que les jeunes feuilles se développent en été. Ces facteurs sont d'ailleurs à l'origine de la diversité des espèces de cécidomyies du genre *Asphondylia* associées à *Larrea tridentata* (Sessé et Moc. ex DC.) Coville, un arbuste pérenne des déserts nord-américains (Joy & Crespi 2007). Les résultats obtenus sur la biologie et la dispersion de *P. mangiferae* apportent des explications à cette absence de diversification.

Premièrement, les expérimentations en laboratoire ont montré qu'une baisse de température inférieure de 26°C à 20°C provoquait l'émergence des larves en diapause, quelle que soient leur origine ou leur date d'entrée en diapause. Les suivis d'émergences en conditions naturelles ont montré une synchronisation des sorties de diapause au début de l'hiver. Ces émergences synchronisées au début de chaque hiver (floraison) favorisent le brassage des populations issues de différentes saisons et des deux types de ressource.

Deuxièmement, le caractère facultatif de la diapause et le faible taux de diapause (< 30%) entraîne une succession continue de générations qui assure un brassage des différentes populations de *P. mangiferae*. En hiver, les premières générations se développent sur les inflorescences et les suivantes en été se développent sur les jeunes feuilles. Au début de chaque hiver, les adultes issus de larves en diapause et les adultes issus des générations continues peuvent se croiser.

Troisièmement, les résultats des travaux de modélisation ont montré que les attractivités des inflorescences (au stade D, en particulier) et des jeunes feuilles sont quasi-

équivalentes. A la réserve près que le modèle ne permet pas de détecter deux populations inféodées aux deux types de ressources, une femelle de *P. mangiferae* a à peu près la même probabilité d'être attirée et de pondre sur l'une ou l'autre ressource quand elles sont présentes simultanément dans le verger. Cette faible différence contribue à la présence simultanée d'individus issus des deux types de ressource.

Nos résultats sur la biologie et l'écologie de *P. mangiferae* sont en faveur du maintien d'une seule espèce capable de se reproduire sur deux types de ressource. Quatre questions de recherche peuvent être envisagées sur les liens entre cette cécidomyie et le manguier :

*Quels sont les effets de la ressource sur les principaux traits de vie de P. mangiferae ?* La qualité de la plante-hôte influence la fitness des insectes herbivores (Shintani 2009) ou la diapause comme mentionné précédemment (Takagi & Miyashita 2008). L'effet du type de ressource sur l'induction et la sortie de la diapause est à prendre en compte mais il devra être étudié en interaction avec les principaux facteurs abiotiques influençant la diapause, la photopériode et la température (Danks 2007). Il s'agit aussi de déterminer l'effet du type de ressource voire de sa « qualité nutritive », par des dosages de composés à définir, sur des traits de vie de la cécidomyie tels que la durée de développement ou le poids des larves qui peuvent avoir un impact sur la mortalité pendant la diapause puis la fécondité des adultes (Liu *et al.* 2009; Liu *et al.* 2007). La quantification de ces effets apportera des données nécessaires à la modélisation du cycle de la cécidomyie des fleurs du manguier et à la compréhension des fluctuations des populations au cours des saisons. Ces études devront être menées en milieu naturel mais également en milieu contrôlé. La reproduction en laboratoire des cécidomyies peut être difficile à cause d'associations symbiotiques entre les femelles et des champignons (Heath & Stireman 2010). Toutefois, des essais que nous avons menés au laboratoire ont montré qu'il était possible d'élever *P. mangiferae* sur des manguiers en pots portant des inflorescences ou des jeunes feuilles. Ces études seraient d'ailleurs originales puisque la plupart des traits de vie étudiés en laboratoire le sont pour des cécidomyies inféodées aux plantes annuelles (Tokuda *et al.* 2007).

*Quels sont les composés volatiles émis par les deux types de ressource et comment les cécidomyies y réagissent-elles ?* Augustyn *et al.* (2010a; 2010b) ont montré que la densité des galles de la cécidomyie des feuilles du manguier, *P. matteiana*, variait selon les cultivars et serait corrélée à la présence de terpènes émis par les feuilles. Des études en tunnel de vol ont déjà testé l'influence des composés émis par les plantes hôtes sur l'attraction des cécidomyies (Hall *et al.* 2012). Nous pouvons supposer que les femelles de *P. mangiferae* sont attirées par des composés volatiles émis par les ressources offertes par le manguier. Des études par électroantennographie couplée à une chromatographie en phase gazeuse permettraient d'identifier et de quantifier les composés stimulants émis par les deux types de ressource. Ces études en écologie chimique permettraient de déterminer si les deux types de ressource émettent les mêmes composés olfactifs et d'évaluer l'attractivité des différentes variétés de

manguier à la Réunion et de la comparer à leur sensibilité aux dégâts. Elles auraient également un intérêt pour le contrôle des populations (cf §4 de ce chapitre).

*Existe-t-il des communautés symbiotiques particulières associées à chaque type de ressource ?* Les bactéries et les champignons peuvent être impliqués dans la formation des galles, dans l'alimentation et la reproduction des insectes (Bansal *et al.* 2011; Sun *et al.* 2011). Medina *et al.* (2011) ont observé des communautés bactériennes différentes associées à deux plantes-hôtes de *Phylloxera notabilis* Pergande (Hemiptera: Phylloxeridae). La cécidomyie *Asteromyia carbonifera* (Osten Sacken) (Diptera : Cecidomyiidae) présente un mutualisme obligatoire avec le champignon *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. (Ascomycota: Dothideomycetes) pour la formation de la galle (Heath & Stireman 2010). Ces associations mutualistes peuvent aussi affecter les traits de vie. Les larves de *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera : Tortricidae) qui consomment le champignon *Botrytis cinerea* ont un meilleur taux de survie et une croissance plus rapide que les larves qui ne s'en nourrissent pas. Après la diapause, les larves nourries avec le *Botrytis* ont une meilleure synchronisation avec leur ressource et une fécondité plus élevée (Mondy & Corio-Costet 2004). Chez *P. mangiferae*, nous avons observé que la forme des galles est très différente en fonction de la ressource. Cette différence pourrait être liée à l'histologie des organes du manguier mais elle pourrait également être associée à des bactéries ou des champignons. L'étude des communautés symbiotiques associées à chaque ressource pourrait apporter des connaissances sur les interactions entre les bactéries/champignons, le manguier et la cécidomyie des fleurs du manguier.

*Quelles sont les relations entre la phylogénie des espèces du genre Procontarinia et l'organe du manguier qu'elles attaquent ?*

A l'échelle du genre *Procontarinia* inféodé au manguier, les relations entre ces espèces et le manguier sont mal connues (Raman *et al.* 2009). Il serait intéressant de déterminer si la phylogénie de ces espèces présente une structuration en rapport avec le type de ressource attaqué, c'est-à-dire de chercher à savoir si les espèces attaquant les feuilles ou les inflorescences forment des groupes différenciés, éventuellement en rapport avec d'autres traits de vie comme la pupaison au sol qui est considérée comme un caractère ancestral (Gagné 1994). Les outils développés lors de mes recherches, comme les amorces COI, pourraient être utilisés.

## **VI.2. Un faible signal de structuration spatiale des populations ?**

La deuxième conclusion remarquable de mes travaux est d'avoir montré une structure des populations de *P. mangiferae* à la Réunion. Dans chaque localité échantillonnée, les populations de *P. mangiferae* se divisaient en deux clusters sympatriques mais avec un cluster plus fréquent dans la zone de production de mangues (côte ouest). Les facteurs pouvant maintenir ces deux clusters en sympatrie ont été discutés précédemment (cf discussion du

chapitre III). Toutefois, le signal de structuration observé à la Réunion est faible. On aurait pu s'attendre a priori à observer une structure spatiale des populations plus marquée. Le relief et les conditions climatiques contrastées de la Réunion auraient pu limiter les flux géniques entre les populations et favoriser leur divergence. Une espèce envahissante peut en effet évoluer rapidement lors de la colonisation d'un nouvel environnement (Sakai *et al.* 2001). Une structure spatiale peut apparaître entre les populations immigrantes qui s'isolent les unes des autres et s'adaptent à leur région d'installation (Dlugosch & Parker 2008). L'introduction unique et récente de *P. mangiferae* (= *Erosomyia mangiferae*) (Etienne 1977; Etienne & Roura 1974) n'a peut-être pas encore permis la mise en place de cette structure spatiale.

Toutefois, nous avons vu dans le chapitre V que les échanges d'individus entre vergers proches sont très importants ce qui assure des flux de gènes importants de proche en proche. Une dispersion sur de plus grandes distances est également possible, comme observé chez *Asphondylia yushimai* Yukawa and Uechi une cécidomyie du soja dont une femelle a été capable de se déplacer sur plus de quatre kilomètres (Yukawa *et al.* 2003). Des déplacements portés par le vent jusqu'à une centaine de kilomètres ont même été estimés pour *Sitodiplosis mosellana* Géhin (Diptera : Cecidomyiidae) au nord de la Chine (Miao *et al.* 2013). Les régimes de vent à la Réunion (les alizées d'Est et les brises de terre et de mer) peuvent favoriser des échanges d'individus entre différentes zones de l'île, ce qui limite l'isolement spatial.

La structuration des populations en deux clusters indique que les flux de gènes sont restreints entre les individus de ces deux groupes. Ces clusters pourraient être liés à des barrières pré- ou postzygotiques. Nous avons recherché la présence d'endosymbiotes chez des individus issus d'une même population mais issus des deux types de ressource. Une PCR avec des amorces spécifiques de cinq endosymbiotes (*Arsenophonus* sp., *Cardinium* sp., *Hamiltonella* sp., *Rickettsia* sp., *Wolbachia* sp.) connues chez les arthropodes (Baumann 2005) n'a pas permis de détecter leur présence sur 32 larves de *P. mangiferae* issues de jeunes feuilles et d'inflorescences échantillonnées sur une localité (CPEA) à la même date (résultats non présentés). La présence d'endosymbiotes (connus) chez *P. mangiferae* a par conséquent été exclue.

Les résultats de nos travaux de recherche apportent de nouvelles questions concernant la distribution mondiale.

#### *Quelle est la diversité génétique de P. mangiferae en Inde et dans le monde ?*

Une étude phylogéographique à l'aide des marqueurs microsatellites développés lors de cette thèse permettrait de déterminer l'origine des populations de la Réunion et de tester l'existence d'un goulot d'étranglement lors de l'introduction à la Réunion. A partir d'un échantillonnage mondial de *P. mangiferae*, ses routes de diffusion pourraient être retracées et comparées à celles du manguier. Les données microsatellites devraient être complétées par le séquençage de gènes mitochondriaux. Le gène COI a montré un faible polymorphisme sur les

populations de la Réunion (chapitre III). Il pourrait être complété par le gène mitochondrial NADH déshydrogénase sous-unité 4 qui révèle plus de polymorphisme que le gène COI chez les populations chinoises de la cécidomyie orangée du blé, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera : Cecidomyiidae) (He *et al.* 2006).

### VI.3. Les stratégies de vie de la cécidomyie des fleurs du manguier

#### VI.3.1. Traits de vie

L'échantillonnage réalisé lors de l'étude de la structure génétique des populations a permis de détecter *P. mangiferae* dans toutes les localités où le manguier était présent. Des populations se maintiennent dans des milieux aux conditions climatiques très variées : depuis une pluviométrie de 500 mm (côte ouest) à plus de 4 000 mm (côte est) et avec des températures annuelles variant de 11,1°C (moyennes des minimales à Cilaos) à 29,1°C (moyennes des maximales au Port) (Météo France 2012). En Inde, les observations de Prasad (1971) montrent une gamme de présence encore plus grande puisqu'il signale cette espèce depuis le Cap Comorin au climat tropical humide jusqu'aux pieds de l'Himalaya au climat subtropical humide. Cette distribution expose *P. mangiferae* à des températures annuelles moyennes allant de 20°C à plus de 27°C, soit des températures mensuelles moyennes de 7°C (New-Delhi) à plus de 35°C (Nagpur) (Hong Kong Observatory 2012). *P. mangiferae* peut s'adapter à des milieux avec une gamme de températures et de pluviométrie importante.

L'étude de la diapause de *P. mangiferae* a mis en évidence la possible existence de plusieurs mécanismes qui (i) permettent une induction de diapause quelle que soit la saison (photopériode et température) ou la ressource, (ii) modifient la sortie de diapause aux températures estivales (26°C) selon les conditions d'induction de la diapause (été et jeunes feuilles vs hiver et inflorescences), (iii) assurent une maturation de la diapause à des températures hivernales (20°C) et estivales (26°C). *P. mangiferae* peut donc entrer en diapause dans des conditions d'environnement très différentes.

Cette faculté doit être un avantage pour l'invasion de *P. mangiferae* dans les zones de production de mangues, de la même manière que la plasticité de la diapause de *Rhagoletis completa* Cresson (Diptera : Tephritidae) a été un des éléments de sa dispersion en Amérique du nord (Chen *et al.* 2006). La diapause peut être vue comme un système de sécurité pour les populations en maintenant des individus à l'abri de conditions défavorables. Lors d'une implantation dans un nouvel environnement, la possibilité d'entrer en diapause pour une partie des individus, quelles que soient les conditions, assure la mise en place d'une population qui pourra ensuite se reproduire lors d'une saison plus « sûre » en termes de ressources, l'hiver. Les inflorescences apparaissent chez le manguier après la baisse de température (l'induction florale est liée aux températures fraîches) qui est également le déclencheur de sortie de diapause de *P. mangiferae*.



### VI.3.2. Une diapause facultative dans un habitat presque toujours favorable

Une autre conclusion importante de mes travaux est d'avoir montré que *P. mangiferae* était présent toute l'année avec un taux d'induction de diapause supérieur en été par rapport à l'hiver. La présence continue en milieu tropical est déjà mentionnée chez d'autres cécidomyies et insectes vivant dans des milieux exempts de saisons aux conditions létales. La présence continue d'une cécidomyie a déjà été observée pour une espèce tropicale et oligophage, *A. boerhaaviae* (Freeman & Geoghagen 1989). A ma connaissance, cette observation est la première pour une cécidomyie inféodée à un seul arbre. En comparant nos résultats avec la classification du genre *Asphondylia* établie sur les traits de vie par Uechi & Yukawa (2006), *P. mangiferae* se classerait dans deux groupes : le groupe II pour sa faculté à alterner entre plusieurs organes d'une même plante-hôte et le groupe III pour son multivoltinisme.

Pour un insecte phytophage, la disponibilité et la qualité de la ressource sont essentielles. Le manguier dans les conditions subtropicales de la Réunion est soumis à de forts asynchronismes de croissance et de floraison (Vincenot & Normand 2009) qui assurent la présence quasi continue de ressources pour les cécidomyies. De plus, les températures et les précipitations semblent ne jamais être létales pour la cécidomyie des fleurs du manguier dans les zones de présence de manguier. Par contre, cet habitat « favorable » toute l'année n'exclut pas la présence de contraintes liées à des facteurs abiotiques mais surtout à des facteurs biotiques. La principale contrainte abiotique est liée aux événements climatiques violents et imprévisibles que sont les cyclones et qui peuvent affecter directement les populations de cécidomyies en été. Les vents violents et/ou les fortes pluies peuvent empêcher le vol actif des adultes et la ponte des femelles sur les jeunes pousses du manguier. Ces événements peuvent aussi affecter la disponibilité de la ressource à court terme (destruction des pousses tendres) et à moyen terme (synchronisation des phases phénologiques). Ainsi, suite au cyclone tropical Gamède qui a affecté l'île en 2007, les arbres en pleine fructification ont perdu simultanément leurs fruits ce qui a entraîné la synchronisation des flushs de croissance végétative et florifère suivants. La disponibilité de la ressource d'ordinaire quasi-continue grâce aux asynchronismes, a alors été limitée dans le temps, ce qui aurait pu fortement défavoriser *P. mangiferae* si son développement était exclusivement continu. La diapause apparaît ainsi un moyen de sauvegarde et de synchronisation des émergences avec l'hiver, une saison de présence plus « sûre » de ressources, les inflorescences.

Aux exceptions ci-dessus près, les facteurs abiotiques sont peu importants pour la survie des populations de *P. mangiferae* à la Réunion. Par conséquent, les interactions biotiques (avec la plante-hôte, d'autres espèces phytophages, les prédateurs et parasitoïdes) sont primordiales (Braby 2002). La distribution spatiale et temporelle des deux types de ressources joue un rôle majeur dans leur disponibilité et leur accessibilité aux femelles. Les

inflorescences sont une ressource très favorable à la reproduction de *P. mangiferae*. Elles offrent des sites de pontes depuis le stade D jusqu'au stade G, soit pendant environ un mois (Dambreville *et al.* 2013). Durant cette période, les inflorescences peuvent supporter plusieurs attaques. De plus, le risque de destruction par les cécidomyies diminue avec l'âge de l'inflorescence (Amouroux & Normand 2010). Seules les jeunes inflorescences (stades D et E) qui portent des galles sur leur rachis principal peuvent être entièrement détruites par de fortes infestations. Par contre, les feuilles ont une durée de développement rapide de l'ordre de 8-12 jours (Dambreville *et al.* 2013), et la période de sensibilité aux attaques est très courte. Cependant, l'asynchronisme de croissance végétative assure une disponibilité de la ressource sur une longue période. Toutefois, un arbre dont la croissance végétative a été attaquée ne pourra pas subir une nouvelle attaque à cause du délai nécessaire entre deux pousses végétatives successives, en moyenne deux mois (Dambreville *et al.* 2013). Les individus émergeant au pied d'un tel arbre devront se déplacer vers un autre arbre ou un autre verger pour accéder à de la ressource. Ces déplacements d'individus entre vergers ou arbres proches peuvent s'effectuer grâce à une dispersion passive orientée suivie d'un déplacement actif vers les ressources les plus attractives. La présence de manguier à proximité du point de chute est alors essentielle puisque nous avons estimé que la ressource n'était plus attractive au-delà d'une dizaine de mètres (chapitre V). Dans le cas de déplacements sur de longues distances, le vent peut jouer un rôle important chez les cécidomyies (Withers & Harris 1997). Cependant, ces déplacements passif sur une ou moins grande distance doivent probablement être la cause d'une forte mortalité et pourraient expliquer que les niveaux de populations sont plus faible en été qu'en hiver. Le rôle des manguiers isolés (jardins particuliers, bord de route) dans la dynamique de populations et la mortalité des femelles lors de ces déplacements est à considérer mais n'a pas encore été étudié.

Une interaction biotique top-down peut également influencer la démographie des populations de *P. mangiferae*. Nous avons vu que le taux de parasitisme pouvait atteindre les 50% sur les jeunes feuilles en été (Annexe II). Un complexe d'au moins trois parasitoïdes s'attaque aux larves à la Réunion. L'étude de la biologie et de la dynamique des parasitoïdes pourrait permettre de mieux évaluer leur impact sur les fluctuations des populations au cours du temps. Ainsi, l'hyménoptère *Platygaster demades* Walker (Hymenoptera : Platygasteridae), parasitoïde d'une cécidomyie du pommier *Dasineura mali* Kieffer (Diptera : Cecidomyiidae), contribue au déclin des populations de cécidomyies (He & Wang 2011). Cette efficacité de *P. demades* est assurée par une stratégie de recherche efficace et une dynamique de superparasitisme qui évite la surexploitation des populations de *D. mali* (He & Wang 2011) ainsi que par sa stratégie de diapause estivale évolutive dans la saison (He *et al.* 2010).

Les conditions climatiques et biotiques favorables de la Réunion ont pu favoriser le multivoltinisme de *P. mangiferae*. Le taux de diapause plus élevé en été semble apparaître

comme une solution pour mettre à l'abri des individus qui seraient soumis à de fortes contraintes biotiques (distribution de la ressource, taux de parasitisme important) et abiotiques (cyclone). Ces individus en diapause peuvent engendrer une nouvelle population quand les conditions deviennent plus favorables. La diapause prolongée, discutée dans le chapitre IV, est une stratégie supplémentaire qui permet la survie de populations sur le long terme et qui permet de répondre à la variabilité annuelle de la ressource disponible entre les saisons de floraison (liée à alternance de floraison du manguier).

Les résultats de nos travaux de recherche apportent de nouvelles questions concernant les relations entre les stratégies de vie de *P. mangiferae* et son habitat.

*Les stratégies de vie développées par P. mangiferae sont-elles différentes en fonction de l'habitat ?* Les conditions climatiques de la Réunion permettraient d'étudier les stratégies de vie de populations soumises à des conditions abiotiques (pluviométrie, température) et biotiques (densité de manguier, phénologie) contrastées. La côte ouest, zone de production de mangues, a une densité de manguier plus importante qui doit être plus favorable à la présence continue de cécidomyie. Il s'agirait de comparer en particulier les dynamiques de populations, la fréquence de la diapause facultative, le taux de parasitisme dans des populations issues de régions différentes (ouest, sud, est) afin de déterminer les réponses propres à chaque population pour s'adapter aux conditions locales. Les résultats pourraient permettre d'évaluer l'importance de ces conditions (biotiques et abiotiques) dans la dynamique des populations.

*Quelle est la cause des faibles taux de diapause observés dans les populations de la Réunion ?* En climat subtropical en Inde, les populations de *P. mangiferae* entrent en diapause à 100% à la fin de la période de floraison (Mai) (Prasad 1971). Deux hypothèses pourraient être testées. Premièrement, il pourrait s'agir d'une adaptation de la diapause aux conditions de la Réunion. Ainsi, la photopériode critique peut varier en fonction de la latitude comme observée chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera : Chrysomelidae). Cette adaptation peut évoluer rapidement après une introduction, en moins de 70 ans chez le coléoptère *Acanthoscelides pallidipennis* (Motschulsky) (Coleoptera : Bruchidae) (Sadakiyo & Ishihara 2011). Les populations de cécidomyies des fleurs à la Réunion auraient pu s'adapter d'autant plus rapidement que l'on peut estimer le nombre de générations à plus de 17 par an. Deuxièmement, la diapause facultative pourrait être un trait de vie hérité des individus introduits à la Réunion. En effet, la sensibilité aux facteurs inducteurs de la diapause peut être transmise génétiquement (Chen *et al.* 2012; Xia *et al.* 2012). Prasad (1971) signale que *P. mangiferae* est présent toute l'année au sud de l'Inde sans toutefois préciser les taux de diapause. L'introduction de populations originaires de cette région pourrait aussi expliquer la diapause observée à la Réunion. L'étude phylogéographique permettrait de retracer les routes d'invasion de *P. mangiferae* et de confirmer ces hypothèses.

Les perspectives proposées dans cette discussion pourraient faire partie d'un projet global visant à modéliser la dynamique des populations d'insecte en fonction de la ressource. Nylin (2001) souligne qu'un modèle prédictif des populations d'un insecte demande de connaître les facteurs biotiques et abiotiques qui influencent son développement et sa dynamique mais également de connaître l'effet de ces facteurs sur sa ressource. Ainsi, les résultats des études proposées sur les durées de développement, sur la vitesse de croissance des larves mais également sur les fluctuations de populations dans les vergers et leurs causes (mortalité, parasitisme, dispersion, immigration, facteurs abiotiques, ressource...) pourraient être couplés à un modèle de développement du manguier. Ce modèle est en cours d'élaboration à la Réunion. Il pourra permettre de prédire le type et la quantité de ressources disponibles à l'échelle d'un arbre ou d'un verger.

#### **VI.4. Perspectives appliquées en terme de contrôle des populations**

Nos résultats ont montré qu'un verger exempt de cécidomyies des fleurs du manguier peut être colonisé en une seule saison par un très grand nombre de femelles non-natives de ce verger. Les populations engendrées par ces femelles assurent à court ou moyen terme la mise en place d'une population native à ce verger. Ce résultat est donc en faveur du déploiement de méthodes de protection des vergers à l'échelle d'une zone géographique et pas seulement à l'échelle d'un verger ou d'une exploitation. Ainsi, alors que des essais de lutte contre la cécidomyie de l'abricotier par traitement du sol ont montré leur efficacité pour limiter les émergences d'adultes (Gomez 2005), les dégâts observés sur les arbres traités et les arbres témoins étaient équivalents. Les auteurs suggèrent que la contamination des arbres traités était due à des adultes venant des arbres voisins non traités et envisagent une expérimentation à plus grande échelle. Ces résultats jouent en faveur de la mise en place de méthode de lutte à une grande échelle.

La lutte contre la cécidomyie des fleurs du manguier peut s'envisager à plusieurs niveaux avec des actions dirigées soit directement contre les larves ou les adultes, soit indirectement sur leur ressource.

Les larves au sol pourraient être contrôlées avec des traitements de sol. Des traitements à base de décoction de *Quassia amara* L. se sont montrés efficaces pour limiter les émergences des adultes de la cécidomyie de l'abricotier (Gomez 2005). Des traitements à base de champignons entomopathogènes ou de nématodes parasites pourraient être envisagés. Nos essais préliminaires en laboratoire n'ont pas mis en évidence d'effet pathogène de deux souches de *Beauveria* sp. sur des larves non diapausantes de *P. mangiferae* (données non présentées, (Bricca *et al.* soumis)). Des essais complémentaires sont nécessaires pour tester l'effet de ces souches et d'autres souches de *Beauveria* ou d'autres entomopathogènes sur des larves en diapause qui y seraient exposées plus longtemps.

Une phase critique du cycle se situe lorsque les larves quittent la ressource dans le manguier pour tomber au sol. Une méthode de lutte pourrait consister à bloquer les larves ou à augmenter leur temps de présence à l'extérieur pour favoriser la mortalité et la prédation. La couverture intégrale du sol d'un verger (chapitre V) a permis de limiter fortement les dégâts observés sur la parcelle bâchée par rapport à la parcelle témoin (données non présentées). Toutefois, cette pratique semble très contraignante (mise en place, gestion du système d'irrigation, déplacements mécanisés dans le verger,...) dans le cadre d'un verger productif. L'efficacité d'une couverture synthétique biodégradable (Tournebize 2012), limitée au rang (l'aplomb des arbres), pourrait être testée. Cette couverture aurait un possible effet de solarisation sur les larves en diapause dans le sol. Par ailleurs, des essais pourraient être menés sur l'effet d'une couverture naturelle (enherbement, mulch, paillis).

Les larves à l'intérieur de la ressource peuvent aussi être contrôlées. Si les larves dans les galles sont protégées des insecticides de contact, un traitement systémique pourrait être efficace. C'est une piste suivie actuellement par l'Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière Légumière et HORTicole (ARMEFLHOR). Une destruction manuelle des organes les plus infestées peut de même diminuer les populations efficacement. Cette méthode est d'ailleurs la seule conseillée au Brésil (Barbosa 2005). Elle peut être envisageable au moins en début de saison pour diminuer les populations lors des premiers cycles en début d'hiver sur les premières inflorescences. Nous avons également observé la présence d'au moins trois espèces de parasitoïdes sur les larves. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la phénologie de ces espèces et leur importance dans le contrôle des populations. Cependant, il est possible dès à présent de mettre en place des mesures favorisant les parasitoïdes et d'une manière générale la biodiversité fonctionnelle (enherbement, bandes fleuries...) (Ratnadass *et al.* 2012).

Le dernier type d'actions directes pourrait être dirigé contre les adultes. Les traitements insecticides sont peu efficaces avec les matières actives homologuées (Barbosa *et al.* 2002). Un meilleur contrôle de la date d'application pourrait augmenter leur efficacité. Toutefois, ces traitements insecticides ont un impact majeur sur l'équilibre biologique des vergers. La recherche de méthodes de lutte ciblées sur cette espèce est à développer. Les études d'écologie chimique proposées précédemment pourrait permettre d'isoler des composés attractifs (ou répulsifs) impliqués dans la reconnaissance de sa plante-hôte par *P. mangiferae* (Hall *et al.* 2012) ou dans la reconnaissance des femelles par les mâles (phéromones sexuelles) (Andersson *et al.* 2009; Hillbur *et al.* 1999; Hillbur *et al.* 2005). Ces composés pourraient servir au suivi des populations, pour des techniques de 'mating disruption' ou de 'male aniling' (Anderson *et al.* 2012; Hillbur *et al.* 2000; Samietz *et al.* 2012).

Nous avons vu l'importance de la ressource pour les espèces phytophages. Une maîtrise de la phénologie du manguier pourrait permettre de diminuer les périodes de

sensibilité d'un verger et de faciliter le contrôle des populations de bio-agresseurs. En regroupant la période de floraison à l'échelle d'un verger, on diminue la durée de disponibilité des ressources, ce qui limite l'augmentation des populations au fur et à mesure des générations, ainsi que les actions de protection du verger dans le temps. A grande échelle, la synchronisation des vergers permettrait d'empêcher pendant la floraison les transferts de populations d'un verger en fin de floraison vers un autre verger en début de floraison. Cependant, la synchronisation de la floraison entraîne une synchronisation des récoltes. A grande échelle, une mise sur le marché groupée pourrait réduire le prix de vente pour les producteurs. Une suppression de tous les stades sensibles lors de la période de repos végétatif du manguier (mai-juin) permettrait de supprimer pendant cette période les ressources qui favorisent une reproduction continue des cécidomyies dans le verger. L'efficacité de cette action pourrait dépendre du rôle relatif des diapausants et des populations à développement direct dans la reprise des infestations en début d'hiver. De même, il serait intéressant de déterminer le rôle des diapausants de longue durée (d'un hiver à l'autre) et des diapausants de courte durée (d'un été à l'hiver suivant) pour déterminer sur quelles populations privilégier les efforts de contrôle. Enfin, les manguiers des vergers créoles et non-cultivés (bord de route...) devraient aussi être pris en compte pour connaître leur rôle dans la dynamique des populations.

## CONCLUSION GENERALE

---

Ces travaux de recherche ont permis de mettre à jour les connaissances sur la cécidomyie des fleurs du manguier, *P. mangiferae*, mais aussi de décrire les caractéristiques des populations de l'île de la Réunion. Avant ces travaux, *P. mangiferae* était considérée comme présente uniquement en hiver, avec une distribution spatiale mal renseignée et non actualisée (dans les zones de production du nord-est au sud de l'île en passant par la côte ouest). L'existence de plusieurs espèces avait même été évoquée pour expliquer les différents types de dégâts observés sur les feuilles et les inflorescences.

L'étude de la diversité et de la structure génétique des populations a permis de démontrer que *P. mangiferae* était la seule espèce présente sur toute l'île et toute l'année dans la zone de présence du manguier à la Réunion, en alternant entre deux types de ressources, les inflorescences et les jeunes feuilles. Le développement d'outils moléculaires (marqueurs microsatellites) spécifiques à cette espèce et la validation de marqueurs mitochondriaux (COI) ouvrent la voie pour de nouvelles recherches à la fois dans sa zone d'origine (Inde) mais aussi dans les autres pays producteurs de mangue. Enfin, les conclusions de cette étude nous ont apporté une nouvelle vision de la dynamique des populations de cette espèce.

Les résultats précédents ont modifié notre hypothèse de départ qui était que l'ensemble des individus entraient en diapause à la fin de la floraison. Nous avons ainsi étudié non seulement l'induction et la sortie de la diapause en hiver mais également en été. Cette diapause facultative est apparue comme adaptée aux conditions biotiques (phénologie du manguier) et abiotiques (température, photopériode) de la Réunion.

Enfin, l'étude de la colonisation d'un verger a permis de déterminer les modes et les capacités de dispersion lors de la colonisation d'un verger depuis une source extérieure, en prenant en compte l'hétérogénéité spatiale et temporelle de la ressource. Ces résultats répondent également à des hypothèses liées à l'attractivité des différents types et stades phénologiques de la ressource.

Ces résultats apportent de nouvelles pistes de recherche à la fois pour des approches écologiques et biologiques sur les relations entre un insecte phytophage et sa plante-hôte, et pour des approches appliquées dans le cadre d'une intensification écologique des pratiques agricoles.



## Références bibliographiques

- Amouroux P, Normand F (2010) Survey of mango pests on Réunion Island, with a focus on pests affecting flowering. In: *9th International Mango Symposium*, p. 24, Sanya, China.
- Anderson KM, Hillbur Y, Reber J, *et al.* (2012) Using Sex Pheromone Trapping to Explore Threats to Wheat From Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) in the Upper Great Plains. *Journal of Economic Entomology* **105**, 1988-1997.
- Andersson M, Haftmann J, Stuart J, *et al.* (2009) Identification of Sex Pheromone Components of the Hessian Fly, *Mayetiola destructor*. *Journal of Chemical Ecology* **35**, 81-95.
- Augustyn WA, Botha BM, Combrinck S, Du Plooy W (2010a) Correlation of volatile profiles of twenty mango cultivars with their susceptibilities to mango gall fly infestation. *South African Journal of Botany* **76**, 710-716.
- Augustyn WA, Botha BM, Combrinck S, Maree JE, du Plooy GW (2010b) Effect of secondary metabolites on gall fly infestation of mango leaves. *Flavour and Fragrance Journal* **25**, 223-229.
- Ballabeni P, Rahier M (2000) Performance of leaf beetle larvae on sympatric host and non-host plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **97**, 175-181.
- Bansal R, Hulbert S, Schemerhorn B, *et al.* (2011) Hessian Fly-Associated Bacteria: Transmission, Essentiality, and Composition. *Plos One* **6**.
- Barbosa FR (2005) Manejo integrado de pragas da mangueira. *Annals of the I Simposio de Mango do vale do Sao Francisco*, 1 - 38.
- Barbosa FR, Bezerra da Silva CS, de Lima CPF, de Cassia Rodrigues Gonçalves Gervasio R (2006) Estudo comparativo entre o nível populacional de *Erosomyia mangiferae* (Diptera: Cecidomyiidae) na bordura e interior da parcela de mangueira em producao integrada XXI Congresso Brasileiro de Entomologia.
- Barbosa FR, Gonçalves ME, De Souza EA, *et al.* (2002) Chemical control of *Erosomyia mangiferae* on mango trees at the sao francisco river valley, Brazil. *Annals of the VII International Mango Symposium*, 261-261.
- Baumann P (2005) Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology* **59**, 155-189.
- Braby MF (2002) Life history strategies and habitat templets of tropical butterflies in north-eastern Australia. *Evolutionary Ecology* **16**, 399-413.
- Bricca E, Nibouche S, Delatte H, Normand F, Amouroux P (soumis) Test of the pathogenicity of two commercial Beauveria strains pathogenic on third instar larvae of the mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae). *Fruits*.
- Chen C, Xia Q-W, Chen Y-S, Xiao H-J, Xue F-S (2012) Inheritance of photoperiodic control of pupal diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Journal of Insect Physiology* **58**, 1582-1588.
- Chen YH, Opp SB, Berlocher SH, Roderick GK (2006) Are bottlenecks associated with colonization? Genetic diversity and diapause variation of native and introduced *Rhagoletis completa* populations. *Oecologia* **149**, 656-667.

- Dambreville A, Normand F, Lauri P-É (2013) Plant growth co-ordination in natura: a unique temperature-controlled law among vegetative and reproductive organs in mango. *Functional Plant Biology* **40**, 280-291.
- Danks HV (2007) The elements of seasonal adaptations in insects. *Entomological Society of Canada* **139**, 1-44.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008) Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history evolution despite genetic bottlenecks. *Ecology Letters* **11**, 701-709.
- Etienne J (1977) Notes sur les cécidomyies du manguier à la Réunion (ed. I.R.A.T.). I.R.A.T., Ile de la Réunion, France.
- Etienne J, Roura A (1974) Note sur l'entomofaune des manguiers à la Réunion. In: *Rapport I.R.A.T.* (ed. I.R.A.T.), pp. 89-92, Ile de la Réunion, France.
- Freeman BE, Geoghagen A (1989) A population study in Jamaica on the gall-midge *Asphondylia boerhaaviae*: A contribution to spatial dynamics. *Journal of Animal Ecology* **58**, 367-382.
- Friberg M, Haugen IMA, Dahlerus J, Gotthard K, Wiklund C (2011) Asymmetric life-history decision-making in butterfly larvae. *Oecologia* **165**, 301-310.
- Gagné RJ (1994) *The gall midges of neotropical region* Cornell University Press, New York, USA.
- Gomez C (2005) Maitriser la cécidomyie de l'abricotier - Bilan de plusieurs années d'essai. *Arbo Bio* **98**, 4-5.
- Hall DR, Amarawardana L, Cross JV, *et al.* (2012) The Chemical Ecology of Cecidomyiid Midges (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Chemical Ecology* **38**, 2-22.
- He H, Yuan X, Wei C, Yuan F (2006) Genetic Variation of the Mitochondrial ND4 Region among Geographical Populations of *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) in China. *Journal of the Kansas Entomological Society* **79**, 211-221.
- He XZ, Wang Q (2011) Phenological Dynamics of *Dasineura mali* (Diptera: Cecidomyiidae) and Its Parasitoid *Platygaster demades* (Hymenoptera: Platygasteridae) in Apple Orchards. *Journal of Economic Entomology* **104**, 1640-1646.
- He XZ, Wang Q, Walker JTS, Rogers DJ, Lo PL (2010) A sophisticated life history strategy in a parasitoid wasp: Producing univoltine and multivoltine phenotypes in a local population. *Biological Control* **54**, 276-284.
- Heath JJ, Stireman JO, III (2010) Dissecting the association between a gall midge, *Asteromyia carbonifera*, and its symbiotic fungus, *Botryosphaeria dothidea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **137**, 36-49.
- Hillbur Y, Anderson P, Arn H, Bengtsson M, Lofqvist J (1999) Identification of sex pheromone components of the tea midge, *Contarinia pisi* (Diptera:Cecidomyiidae). *Naturwissenschaften* **86**, 292-294.
- Hillbur Y, Celander M, Baur R, *et al.* (2005) Identification of the sex pheromone of the swede midge, *Contarinia nasturtii*. *Journal of Chemical Ecology* **31**, 1807-1828.
- Hillbur Y, El-Sayed A, Bengtsson M, *et al.* (2000) Laboratory and field study of the attraction of male pea midges, *Contarinia pisi*, to synthetic sex pheromone components. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 1941-1952.
- Hong Kong Observatory (2012)  
[http://www.weather.gov.hk/wxinfo/climat/world/eng/asia/india/hyderabad\\_e.htm](http://www.weather.gov.hk/wxinfo/climat/world/eng/asia/india/hyderabad_e.htm).

- Joy JB, Crespi BJ (2007) Adaptive radiation of gall-inducing insects within a single host-plant species. *Evolution* **61**, 784-795.
- Liu ZD, Gong PY, Heckel DG, *et al.* (2009) Effects of larval host plants on over-wintering physiological dynamics and survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* **55**, 1-9.
- Liu ZD, Gong PY, Wu KJ, *et al.* (2007) Effects of larval host plants on over-wintering preparedness and survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* **53**, 1016-1026.
- Medina RF, Nachappa P, Tamborindeguy C (2011) Differences in bacterial diversity of host-associated populations of *Phylloxera notabilis* Pergande (Hemiptera: Phylloxeridae) in pecan and water hickory. *Journal of Evolutionary Biology* **24**, 761-771.
- Météo France (2012) Précipitations et températures annuelles moyennes, p. [http://www.meteo.fr/temps/domtom/La\\_Reunion/meteoreunion2/#/38](http://www.meteo.fr/temps/domtom/La_Reunion/meteoreunion2/#/38).
- Miao J, Wu YQ, Gong ZJ, *et al.* (2013) Long-Distance Wind-Borne Dispersal of *Sitodiplosis mosellana* Gehin (Diptera: Cecidomyiidae) in Northern China. *Journal of Insect Behavior* **26**, 120-129.
- Mondy N, Corio-Costet M-F (2004) Feeding insects with a phytopathogenic fungus influences their diapause and population dynamics. *Ecological Entomology* **29**, 711-717.
- Nylin S (2001) Life history perspectives on pest insects: What's the use? *Austral Ecology* **26**, 507-517.
- Prasad SN (1971) *The Mango Midge Pests* Cecidological Society of India, Allahabad, India.
- Raman A, Burckhardt D, Harris KM (2009) Biology and adaptive radiation in the gall-inducing Cecidomyiidae (Insecta Diptera) and Calophyidae (Insecta Hemiptera) on *Mangifera indica* (Anacardiaceae) in the Indian subcontinent. *Tropical Zoology* **22**, 27-56.
- Ratnadass A, Fernandes P, Avelino J, Habib R (2012) Plant species diversity for sustainable management of crop pests and diseases in agroecosystems: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **32**, 273-303.
- Sadakiyo S, Ishihara M (2011) Rapid seasonal adaptation of an alien bruchid after introduction: geographic variation in life cycle synchronization and critical photoperiod for diapause induction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **140**, 69-76.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, *et al.* (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**, 305-332.
- Samietz J, Baur R, Hillbur Y (2012) Potential of Synthetic Sex Pheromone Blend for Mating Disruption of the Swede Midge, *Contarinia nasturtii*. *Journal of Chemical Ecology* **38**, 1171-1177.
- Shintani Y (2009) Effect of seasonal variation in host-plant quality on the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **133**, 128-135.
- Sun XJ, Xiao JH, Cook JM, Feng G, Huang DW (2011) Comparisons of host mitochondrial, nuclear and endosymbiont bacterial genes reveal cryptic fig wasp species and the effects of *Wolbachia* on host mtDNA evolution and diversity. *BMC Evolutionary Biology* **11**.

- Takagi S, Miyashita T (2008) Host plant quality influences diapause induction of *Byasa alcinous* (Lepidoptera : Papilionidae). *Annals of the Entomological Society of America* **101**, 392-396.
- Tokuda M, Yukawa J, Goukon K (2007) Life history traits of *Pseudasphondylia rokuharensis* (Diptera : Cecidomyiidae) affecting emergence of adults and synchronization with host plant phenology. *Environmental Entomology* **36**, 518-523.
- Tournebize R (2012) Couverture biodégradable limitant le développement des adventices, p. <http://transfaire.antilles.inra.fr/spip.php?article8>.
- Uechi N, Yukawa J (2006) Life History Patterns and Host Ranges of the Genus *Asphondylia* (Diptera: Cecidomyiidae). In: *Galling Arthropods and Their Associates*, pp. 275-285. Springer, Tokyo, Japan.
- Vincenot D, Normand F (2009) *Guide de production intégrée de mangues à la Réunion* CIRAD et Chambre d'Agriculture, Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France. 121pp.
- Withers TM, Harris MO (1997) Influence of Wind on Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Flight and Egg-laying Behavior. *Environmental Entomology* **26**, 327-333.
- Xia QW, Chen C, Tu XY, Yang HZ, Xue FS (2012) Inheritance of photoperiodic induction of larval diapause in the Asian corn borer *Ostrinia furnacalis*. *Physiological Entomology* **37**, 185-191.
- Yukawa J, Uechi N, Horikiri M, Tuda M (2003) Description of the soybean pod gall midge, *Asphondylia yushimai* sp. n. (Diptera: Cecidomyiidae), a major pest of soybean and findings of host alternation. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 73-86.

### **I. Effet de la température et de l'humidité sur la durée de nymphose sans diapause chez la cécidomyie des fleurs du manguier, *Procontarinia mangiferae* (Felt)**

#### **INTRODUCTION**

Les modèles de développement sont essentiels pour la mise en place de stratégies de contrôle des populations de bioagresseurs. Ils permettent, entre autres, de prédire les périodes d'abondance d'une espèce. La cécidomyie des fleurs du manguier est un ravageur important de cette culture (Amouroux *et al.* 2009). A la Réunion, elle se reproduit toute l'année (Amouroux *et al.* 2013). En Inde, la durée totale d'un cycle varie entre trois semaines et un mois (Prasad 1971). En conditions naturelles en Iran, le cycle complet de la cécidomyie des fleurs dure entre 14 et 25 jours avec une période de nymphose dans le sol de 6 à 8 jours (Pezhman & Askari 2004). Toutefois, il n'existe encore aucune donnée précise sur la vitesse de nymphose dans le sol. A la Réunion, la température et l'humidité auxquelles les larves peuvent être exposées sont très variables en fonction de la saison (chapitre IV). De plus, les larves peuvent s'être développées soit dans des inflorescences soit dans les feuilles (Amouroux *et al.* 2013).

Les objectifs de cette étude sont : (i) d'estimer la vitesse de nymphose à température constante pour des larves non diapausantes prélevées sur des inflorescences ou sur des feuilles, et (ii) d'estimer l'effet de différents taux d'humidité du sol sur les émergences d'adultes.

#### **MATERIELS ET METHODES**

##### Collecte et mise en émergence des larves

Les larves s'éjectant des manguiers pour tomber sur le sol sont interceptées à l'aide de bâches tendues sous les arbres (chapitre IV). Les larves ont été collectées sous plusieurs arbres mais sous un seul type de ressource : inflorescences ou feuilles. Les collectes ont eu lieu entre le 5 septembre et le 4 octobre 2012 dans un verger de manguiers, variété José, situé à Saint-Gilles (21°02'33" S lat., 55°13'45"E long., 65 m a.s.l.). Au laboratoire, pour une date de collecte, 100 larves sont réparties aléatoirement dans des boîtes hermétiques de 25 mL remplies de 50g de sable stérile, humidifié à 4% (poids/poids) avec de l'eau osmosée. Les

boîtes sont ensuite installées dans des armoires climatiques sous une photopériode L:O de 12:12. Pour limiter les effets potentiels de la date de collecte, les larves sont collectées sur deux jours au maximum pour avoir toutes les conditions de température et/ou d'humidité testées. L'émergence des adultes est suivie quotidiennement pendant 21 jours pour des températures supérieures à 19°C et pendant 27 jours à 15°C afin de ne prendre en compte que les émergences des larves non-diapausantes (Chapitre IV). Le sable est tamisé à la fin de chaque expérimentation pour déterminer le nombre de larves parasitées.

#### Effet de la température et de l'organe

Seize boîtes de 100 larves ont été constituées pour les larves collectées sous des inflorescences. Elles ont été réparties dans six chambres avec des températures constantes de 15, 20, 22.5, 25, 30 et, 32.5°C (Table 1). Huit boîtes de 50 ou 100 larves ont été constituées pour les larves collectées sous les feuilles. Elles ont été réparties dans quatre chambres avec des températures constantes de 15, 20, 25 et 30°C (Table 1).

Annexe I - Table 1 : Récapitulatif du nombre de larves et de lots par température et par organe avec le pourcentage d'adultes émergés et la durée moyenne d'émergence.

<b>Organe de collecte</b>	<b>Température (°C)</b>	<b>Nombre de larves (boîtes)</b>	<b>Taux moyen d'émergence ± SE</b>	<b>Durée moyenne (jours) ± SE</b>
Inflorescences	15	300 (3)	0.85 ± 0.02	17.55 ± 1.82
	20	200 (2)	0.85 ± 0.03	8.42 ± 1.12
	22.5	200 (2)	0.75 ± 0.03	6.07 ± 0.96
	25	400 (4)	0.85 ± 0.02	5.61 ± 0.61
	30	299 (3)	0.76 ± 0.02	4.87 ± 0.85
	32.5	200 (2)	0.00 ± 0.00	-
Unités de Croissance Végétatives	15	150 (2)	0.38 ± 0.04	16.62 ± 0.86
	20	150 (2)	0.58 ± 0.05	8.31 ± 0.63
	25	150 (2)	0.63 ± 0.05	5.61 ± 0.61
	30	150 (2)	0.66 ± 0.05	4.66 ± 0.72

#### Effet de l'humidité à deux températures

Dix-neuf boîtes de 100 larves ont été constituées uniquement avec des larves collectées sous des inflorescences et placées à 25°C et 20°C (Table 2). Le sable a été humidifié à cinq concentrations différentes : 0, 4, 10, 15, 20% (poids/poids). Les boîtes étant fermées hermétiquement, il n'y a pas de perte d'eau. Les émergences sont suivies quotidiennement pendant 27 jours.

Annexe I - Table 2 : Récapitulatif du nombre de lots pour chaque humidité et deux températures avec le pourcentage d'émergence d'adultes et la durée moyenne d'émergence.

Température	Pourcentage d'humidité du substrat (poids/poids)	Nombre de boîtes de 100 larves	Taux moyen d'émergence $\pm$ SE	Durée moyenne $\pm$ SE (jours)
20°C	0	1	0.21 $\pm$ 0.04	9.86 $\pm$ 3.83
	4	2	0.85 $\pm$ 0.04	8.35 $\pm$ 0.83
	10	2	0.79 $\pm$ 0.03	8.53 $\pm$ 1.06
	15	3	0.78 $\pm$ 0.02	8.89 $\pm$ 0.64
	20	1	0.85 $\pm$ 0.04	8.41 $\pm$ 1.11
25°C	0	1	0.62 $\pm$ 0.05	5.57 $\pm$ 0.66
	4	4	0.85 $\pm$ 0.02	5.46 $\pm$ 0.57
	10	2	0.92 $\pm$ 0.02	5.54 $\pm$ 0.79
	15	2	0.65 $\pm$ 0.03	5.75 $\pm$ 0.46
	20	1	0.85 $\pm$ 0.04	5.61 $\pm$ 0.83

### Analyses des données

Les taux d'émergence sont calculés en divisant le nombre total d'individus émergés par le nombre initial de larves moins le nombre de parasitoïdes (émergés ou trouvés dans le sable). Un modèle linéaire généralisé avec une distribution binomiale (données non sur-dispersées) est utilisé pour comparer les taux d'émergences et tester la signification de l'effet de la température (15, 20, 25 et 30°C), de l'organe (inflorescence vs. jeunes feuilles) et de leur interaction. Les températures de 22,5°C et 32,5 °C sont exclues de l'analyse car la première n'est pas présente pour les organes végétatifs et il n'y a pas eu d'émergence pour la seconde. Le même type de modèle est utilisé pour comparer les taux d'émergence pour les différentes humidités, les deux températures et leur interaction. En cas de différence significative, les conditions sont comparées deux à deux.

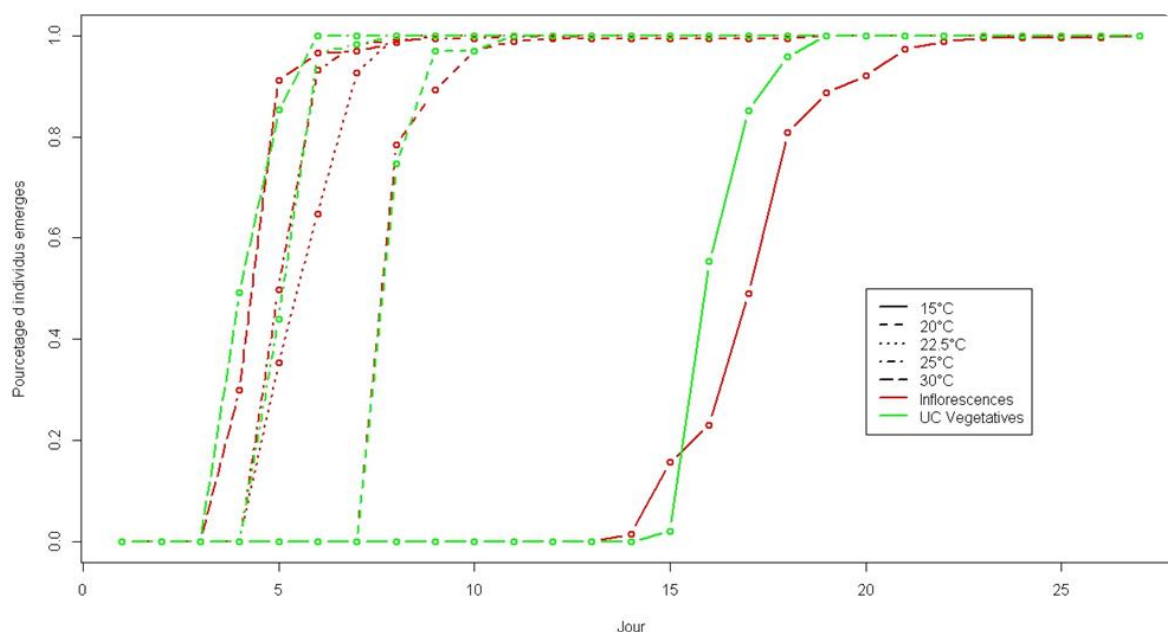
Les analyses ont été faites avec le logiciel R (R Development Core Team 2012).

## **RESULTATS**

### Effet de la température et de l'organe

Les effets de la température et de l'organe sur les dynamiques d'émergence sont présentés dans la figure 1. Les taux d'émergence sont significativement ( $\chi^2 = 19.4$  ; ddl=1 ;  $P < 0.001$ ) différents entre les deux organes, les taux d'émergence des adultes issus de larves

collectées sous les feuilles sont plus faibles ( $0.81 \pm 0.02$ ) que ceux des larves collectées sous les inflorescences ( $0.56 \pm 0.05$ ). L'effet de la température n'est pas significatif ( $\chi^2 = 1.6$  ; ddl=3 ; P=0.67) (Table 1). L'interaction entre la température et l'organe n'est pas significative ( $\chi^2 = 6.7$  ; ddl=3 ; P=0.08). A la température de 32.5°C, aucun adulte n'a émergé.



Annexe I - Figure 1 : Taux d'émergence cumulés pendant 27 jours à cinq températures constantes avec en rouge les larves collectées sous les inflorescences et en vert celles collectées sous les unités de croissance végétatives. Seuls les adultes émergés avant 27 jours sont pris en compte pour les analyses.

### Effet de l'humidité à deux températures

Les taux d'émergence sont significativement différents ( $\chi^2 = 30.0$  ; ddl=4 ; P<0.001) entre les humidités du substrat mais pas entre les températures ( $\chi^2 = 0.7$  ; ddl=1 ; P=0.40) (Table 2). L'interaction entre la température et l'humidité est significative ( $\chi^2 = 16.6$  ; ddl=4 ; P=0.002). A 20°C, seul le taux d'émergence à une humidité de 0% est significativement différent des autres taux d'émergence (P<0.001). A 25°C, il n'y a pas de différence de taux d'émergence entre les différentes humidités.

## **DISCUSSION**

Cette étude a montré que les larves de cécidomyies non-diapausantes se nymphosaient à des températures allant de 15 à 30°C. Par contre, les températures supérieures à 32,5°C se



sont révélées létales pour les larves non-diapausantes. En revanche, 7% de larves ont été trouvées vivantes en cocons dans le sable au 28ème jour. Il s'agissait de larves en diapause qui, par leur état de vie ralentie, pourraient être plus résistantes aux stress environnementaux que les larves non-diapausantes (Danks 1987).

Cette étude a aussi montré que l'organe dans lequel se développaient les larves n'entraînait pas de différence dans les dynamiques d'émergences des adultes. Enfin, une humidité du sol importante peut retarder les émergences des adultes d'une journée mais il n'y a pas d'effet sur les taux d'émergence finaux.

Il s'agit maintenant de continuer à étudier les vitesses de développement des larves dans les organes du manguier afin de pouvoir calculer la totalité d'un cycle de cette espèce en fonction de la température. Enfin, des études sur les individus en diapause doivent être mises en place pour déterminer la date de première émergence. Ces études pourront concourir à prédire les périodes d'abondance de la cécidomyie des fleurs dans les vergers de manguier.

## **PERSPECTIVES**

Les analyses doivent se poursuivre pour comparer les durées d'émergence entre les organes et les températures, et entre les organes et les humidités. Le taux de développement de la cécidomyie pourra être modélisé selon plusieurs modèles : le modèle linéaire (température minimale et la constante thermique K), le modèle de Logan corrigé par Lactin (températures minimale, maximale et optimale) et le modèle de Brière-1 (températures minimale et maximale).

## **Références bibliographiques**

- Amouroux P, Normand F, Nibouche S, Delatte H (2013) Invasive mango blossom gall midge, *Procontarinia mangiferae* (Felt) (Diptera: Cecidomyiidae) in Reunion Island: ecological plasticity, permanent and structured populations. *Biological Invasions* 15 (8):1677-1693.
- Amouroux P, Normand F, Vincenot D (2009) Le raisonnement de la conduite du verger. In: *Guide de Production Intégrée de mangues à la Réunion*. 121pp.
- Danks HV (1987) *Insect Dormancy: an Ecological Perspective* Biological Survey of Canada.
- Pezhman H, Askari M (2004) A study on the biology of mango inflorescence midge in Hormozgan province. *Applied Entomology and Phytopathology* 72, 19-29.
- Prasad SN (1971) *The Mango Midge Pests* Cecidological Society of India, Allahabad, India. 172pp.
- R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. In: *R foundation for statistical computing*. ISBN 3-900051-07-0. Website <http://www.R-project.org/>, Vienna, Austria.

## II. Identification et phénologie de trois parasitoïdes de la cécidomyie des fleurs du manguier, *Procontarinia mangiferae* (Felt), à l'île de la Réunion.

### INTRODUCTION

La cécidomyie des fleurs du manguier est une espèce invasive à la Réunion qui est considérée comme un ravageur important du manguier. Elle se reproduit toute l'année à la Réunion tantôt sur les inflorescences (en hiver), tantôt sur les jeunes feuilles (en été). Les parasitoïdes sont un des moyens de contrôle naturel des populations de bio-agresseurs. L'identification des parasitoïdes est la première étape essentielle pour connaître le cortège de parasitoïdes associé à la cécidomyie des fleurs du manguier et évaluer leur potentiel de contrôle des populations. A la Réunion, des hyménoptères Eulophidae sont cités comme des parasitoïdes non spécifiques de cette cécidomyie (Vincenot & Normand 2009). En Inde, il est fait mention de trois parasitoïdes Chalcidoidea sur les larves : un endoparasite du genre *Platygaster* et deux ectoparasites *Systasis dasyneurae* et *Eupelmus* sp. (Prasad & Grover 1974). Dans la base de données universelles des Chalcidoidea (Noyes 2012), six autres espèces (2 *Aprostocetus*, 2 *Gastrancistrus*, 1 *Tetrastichus* et 1 *Mirufens*) sont associées à *Erosomyia mangiferae* ou *E. indica*, deux synonymes de *Procontarinia mangiferae*.

Les objectifs de cette étude sont d'identifier les parasitoïdes du stade larvaire des cécidomyies des fleurs et d'estimer le taux de parasitisme tout au long de l'année. Il s'agit également de déterminer la dynamique d'émergence de chaque parasitoïde et de déterminer l'origine des larves parasitées (inflorescences ou jeunes feuilles).

### MATERIELS ET METHODES

#### Collecte et mise en émergence des larves

Les larves s'éjectant des manguiers vers le sol sont interceptées à l'aide de bâches tendues sous les arbres (Amouroux et al, chapitre IV). Les larves ont été collectées sous plusieurs arbres mais sous un seul type d'organe par arbre : inflorescences ou jeunes feuilles. Les collectes ont été effectuées sur 15 mois entre le mois d'août 2010 et le mois de juin 2012 (Table 1). Aux mois d'août et de septembre 2010, les larves ont été prélevées dans un verger de manguiers, variété Cogshall, situé au sein du Centre de Production et d'Expérimentation Agricole de Saint-Paul (CPEA: 20° 58' S lat., 55° 18' E long., 130 m a.s.l.). De septembre 2010 à juin 2012, les prélèvements ont été effectués dans un verger de manguiers, variété José, situé sur une exploitation privée de Saint-Gilles (21°02'33" S lat., 55°13'45"E long., 65 m a.s.l.).

Au laboratoire, entre 100 et 250 larves sont distribuées aléatoirement dans des boîtes BioQuip® de 0,5 L du type « boîte de moustique à émergence ». Chaque boîte est remplie de 150g de sable stérile, tamisé à 1mm et humidifié à 5% (poids/poids) avec de l'eau osmosée.

L'humidité est corrigée tous les quinze jours en pesant les boîtes. Les boîtes sont ensuite disposées dans des armoires climatiques maintenues à une température constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  et sous un éclairage jour: nuit de 12:12. Les émergences sont suivies quotidiennement pendant 15 jours puis hebdomadairement.

Annexe II - Table 1 : Origine (année, mois, parcelle et organe) et nombre de larves de cécidomyies prélevées pour le suivi du taux de parasitisme calculé par rapport aux émergences d'adultes de parasitoïdes (août 2010 à avril 2011) ou par rapport au nombre de larves parasitées obtenu par tamisage du sable à trois semaines (juin 2011 à juin 2012).

Année	Mois	Parcelle	Organe	Nombre de larves prélevées	Méthode d'estimation du taux de parasitisme
2010	Août	CPEA	Inflorescence	4010	Emergence des adultes
		CPEA	Inflorescence	906	
2010	Septembre	LYJ	Inflorescence	686	
		LYJ	Feuille	1100	
2010	Octobre	LYJ	Inflorescence	2439	
		LYJ	Feuille	689	Tamisage du sable
2010	Décembre	LYJ	Inflorescence	612	
2011	Février	LYJ	Feuille	200	
2011	Avril	LYJ	Feuille	401	
2011	Juin	LYJ	Inflorescence	397	
2011	Juillet	LYJ	Inflorescence	1300	
2011	Août	LYJ	Inflorescence	400	
2011	Septembre	LYJ	Inflorescence	400	
2012	Janvier	LYJ	Feuille	183	
2012	Février	LYJ	Mélange	270	
2012	Mars	LYJ	Feuille	400	
		LYJ	Feuille	1500	
2012	Avril	LYJ	Inflorescence	200	
2012	Juin	LYJ	Inflorescence	790	

#### Identification morphologique et par séquençage des parasitoïdes

Des échantillons des différents parasitoïdes collectés en 2010 et 2011 ont été envoyés à MM. G. Delvare et P. Rousse pour identification des genres.

Le séquençage d'un fragment d'environ 600 paires de base du gène mitochondrial COI a été réalisé avec les amorces c1J1718 : GGA GGA TTT GGA AAT TGG CTT ATT CC et

c1n2329 : ACT GTA AAT ATG TGA TGT GCT CA (Murphy et al. 2007). Respectivement pour *Platygaster* sp., *Gastrancistrus* sp. et *Inostemma* sp. 10, 8 et 8 individus ont été séquencés. Ces individus ont été choisis pour représenter une large diversité des conditions de collecte (différents mois) et d'émergence (précoce ou tardive).

La PCR est réalisée dans un volume final de 25 µL, avec 2 µL d'ADN, 0.5 µM de chaque amorce, 0.5 µL de Taq-polymerase (Promega), 1.5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de dNTP (2.5 mM), 5 µL de tampon 5X (Promega, Colorless GoTaq® Flexi Buffer) et complété avec de l'eau HPLC. La procédure suivante a été utilisée pour l'amplification : dénaturation à 95°C for 5 min, 35 cycles constitués de 30 s de dénaturation à 94°C, 60 s d'hybridation à 50°C, et 60 s d'élongation à 72°C, une élongation de 5 min à 72°C termine la procédure. Les produits PCR ont été envoyés à Macrogen, Inc. (Seoul, Korea) pour purification et séquençage. Les séquences nucléotidiques seront déposées dans la base de données GenBank.

#### Taux de parasitisme

D'août 2010 à avril 2011, les émergences des différentes espèces de parasitoïdes ont été suivies chaque semaine pendant au moins trois mois. De juin 2011 à juin 2012, le sable contenant les cécidomyies parasitées a été tamisé au bout de trois semaines pour déterminer le taux de parasitisme. Les parasitoïdes n'ont pas pu être identifiés dans ces conditions. Le taux de parasitisme est calculé en divisant le nombre total de parasitoïdes émergés et/ou trouvés dans le sable par le nombre total de larves collectées.

#### Dynamique d'émergence des parasitoïdes

Pour les larves collectées aux mois d'août et septembre 2010, les émergences des parasitoïdes ont été suivies pendant 28 semaines.

#### Analyses

Les séquences de COI seront comparées aux séquences disponibles dans GenBank puis une reconstruction phylogénétique sera effectuée (analyses en cours, non présentées ici).

L'effet de la méthode d'estimation (émergence vs. tamisage) sur le nombre de parasitoïdes, de larves de cécidomyie en diapause, d'adultes de cécidomyie émergés et d'individus morts et non trouvés est testé pour chaque variable par un test de Fisher au seuil de 5%.

Les analyses statistiques doivent encore être réalisées. Il s'agira de comparer les taux de parasitisme entre mois et types de ressources. Pour déterminer des préférences saisonnières ou d'origine des larves, il s'agira de comparer les proportions mensuelles de chaque parasitoïde et l'origine des larves parasitées par chaque espèce. La dynamique d'émergence de *Platygaster* sp. et de *Gastrancistrus* sp. sera comparée pour tester des décalages d'émergence.

## RESULTATS

### Identification morphologique et moléculaire des parasitoïdes

Trois genres de micro-hyménoptères identifiés sont : *Platygaster* sp., *Gastrancistrus* sp., and *Inostemma* sp. Ces déterminations pourront être validées par le séquençage du genre mitochondrial COI.

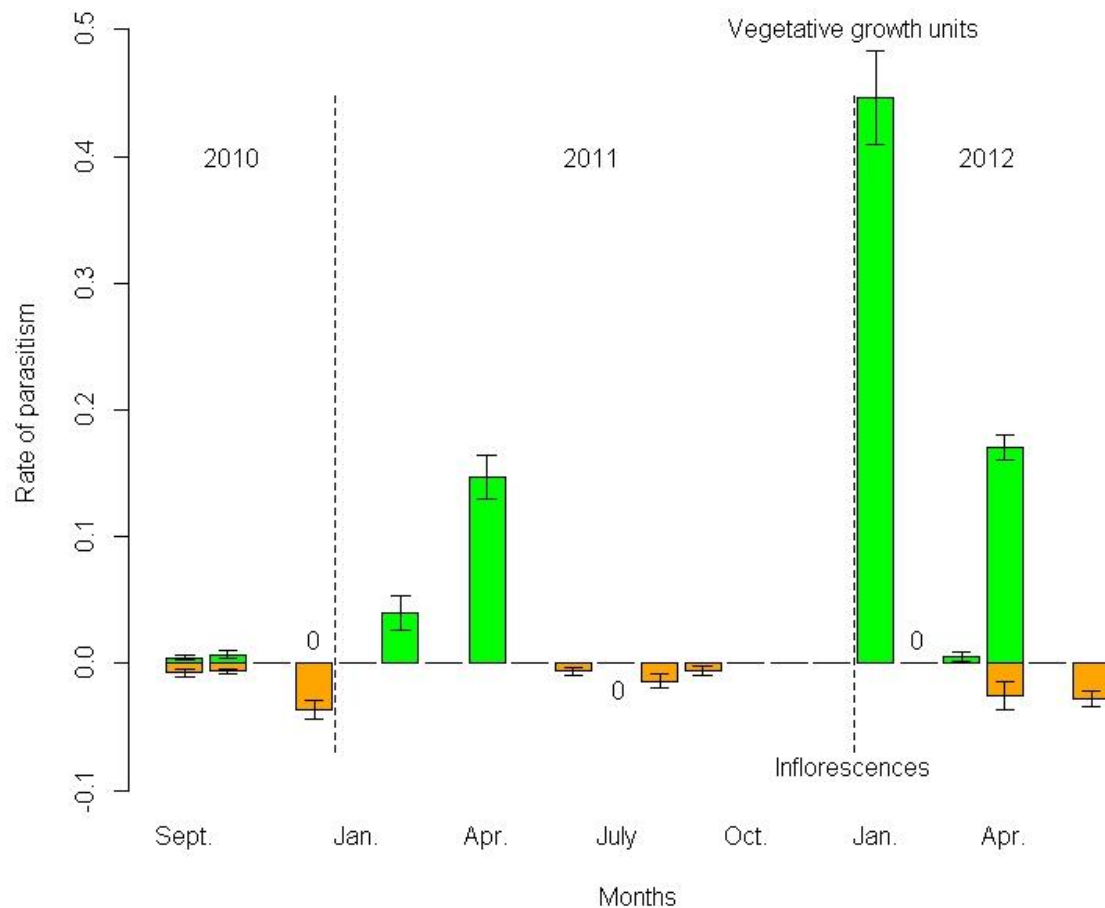
### Taux de parasitisme

Les taux de parasitisme obtenus grâce aux données collectées en 2010-2011 par le suivi de la dynamique des parasitoïdes et grâce aux données collectées en 2011-2012 en tamisant le sable sont comparables. En effet, au mois de mars 2012, les deux techniques ont été utilisées sur des lots de même origine (données d'émergence non présentées dans la Table 1). Aucune différence significative n'est apparue dans les taux de parasitisme entre les deux méthodes (Table 2).

Annexe II - Table 2 : Nombre de parasitoïdes, de larves de cécidomyie en diapause, d'adultes de cécidomyie émergés et d'individus morts et non trouvés pour les deux méthodes d'émergence, comparaison par un test de Fisher.

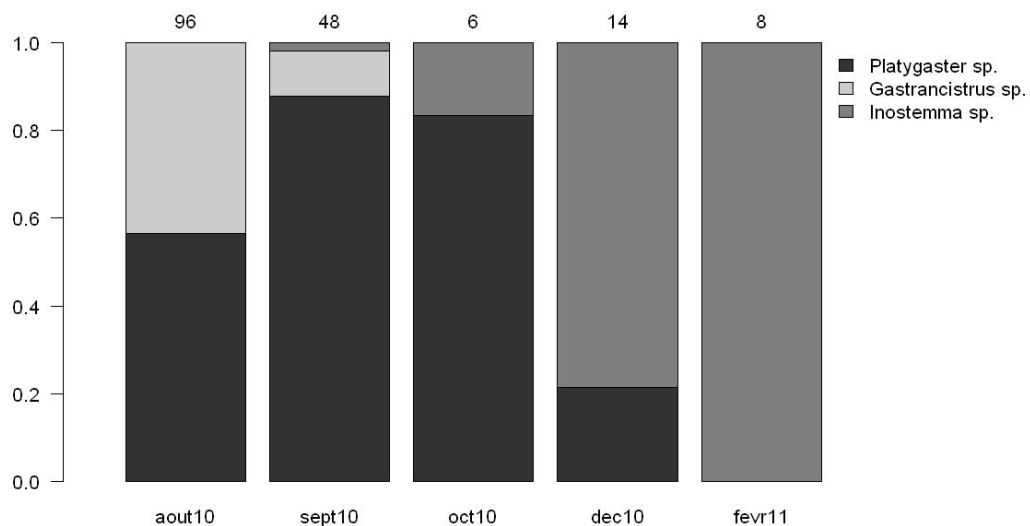
	Number of individuals found by		P value
	Sieving method	Emergence method	
Parasitoids	7	25	1.000
Larvae into diapause	47	44	<b>4.99E-08</b>
Immediate emergence	311	910	0.457
Death individuals	35	271	<b>1.99E-07</b>
<b>Total larvae introduced</b>	<b>400</b>	<b>1250</b>	-

Sur le verger de Saint-Gilles, le parasitisme n'excède jamais 5% sur inflorescences quelle que soit la saison (Figure 1). Par contre, sur les jeunes feuilles en été, le taux de parasitisme est très variable et peut dépasser les 40 % (Figure 1, Janvier à Avril 2012).

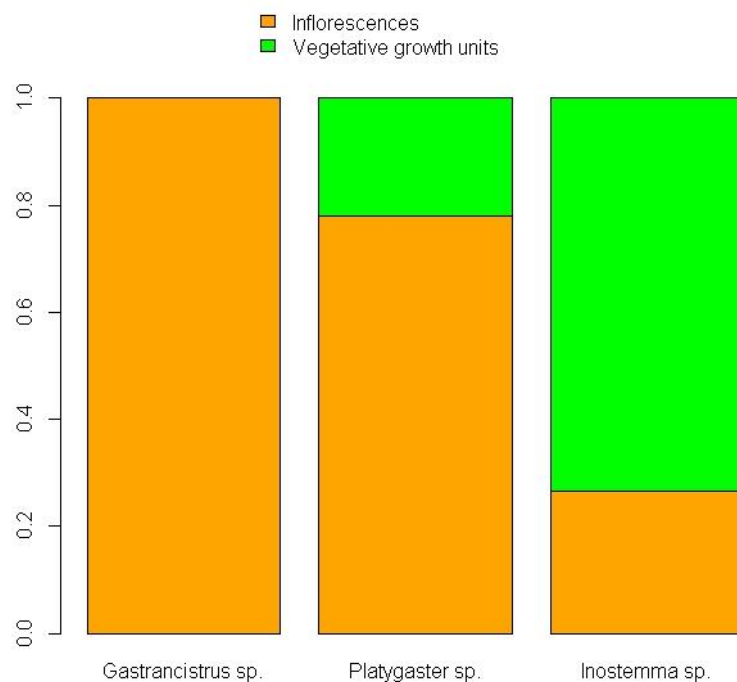


Annexe II - Figure 1 : Taux de parasitisme mensuel pour 14 dates entre septembre 2010 et juin 2012 sur la période de Saint-Gilles. Au-dessus de l'axe, le taux de parasitisme sur des larves provenant de jeunes feuilles. Au-dessous de l'axe, le taux de parasitisme sur des larves provenant d'inflorescences. Le chiffre « 0 » et sa position par rapport à l'axe indiquent un taux de parasitisme nul pour le mois et le type de ressource concerné.

*Gastrancistrus* sp. est uniquement observé en hiver mais peut représenter jusqu'à 50% des parasitoïdes présents (Figure 2). Il ne parasite que des larves de cécidomyies se développant dans les inflorescences (Figure 3). *Platygaster* sp. a été retrouvé de la saison de floraison jusqu'au début l'été (décembre) majoritairement sur des larves se développant dans les inflorescences. *Innostemma* sp. a été retrouvé à partir de la fin de la floraison et durant tout l'été majoritairement sur des larves issues de jeunes feuilles.



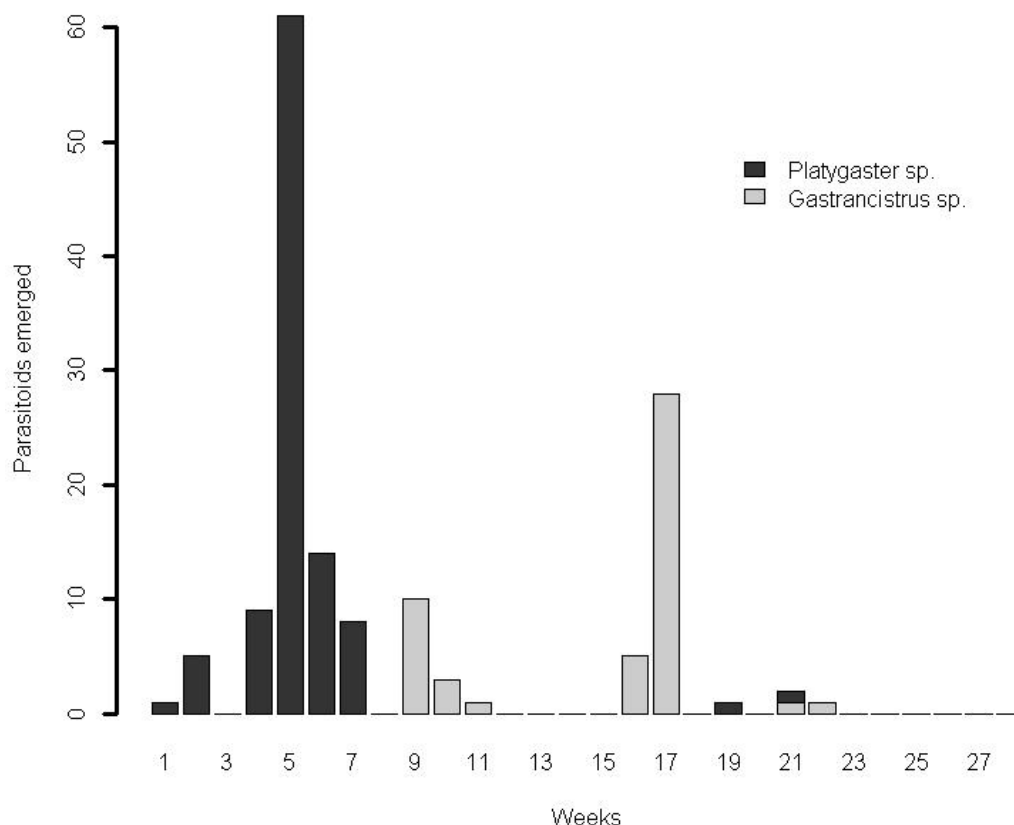
Annexe II - Figure 2 : Proportion de chaque parasitoïde pour cinq mois de août 2010 à février 2011. Les chiffres au-dessus des barres indiquent les effectifs.



Annexe II - Figure 3 : Origine des larves parasitées : inflorescences en orange et jeunes feuilles en vert. Proportions pondérées par le nombre de larves collectées sur chaque organe.

#### Dynamique d'émergence des parasitoïdes

Les émergences de *Platygaster* sp. ont été observées entre la première et la septième semaine de récolte (Figure 4). Quelques émergences tardives se sont produites en semaine 19 et 21. Par contre, les émergences de *Gastrancistrus* sp. étaient regroupées durant les semaines 9 à 11, puis 16 et 17 et enfin 21 et 22. Ainsi, mêmes si les deux espèces parasitaient les larves de cécidomyie en même temps, les émergences des adultes sont décalées dans le temps.



Annexe II - Figure 4 : Dynamique d'émergence à 20°C de *Platygaster* sp. en noir et de *Gastrancistrus* sp. en gris pendant 27 semaines pour des larves collectées en août et septembre 2010. Semaine 0 correspond à la semaine de collecte des larves.

## DISCUSSION

Trois micro-hyménoptères parasitoïdes ont été trouvés sur les larves de cécidomyies du troisième stade larvaire, stade auquel les larves de cécidomyies s'éjectent du manguier vers le sol. Ils appartiennent aux genres *Gastrancistrus* sp., *Platygaster* sp. et *Inostemma* sp. Ces trois parasitoïdes semblent exploiter leur ressource de manière distincte. *Platygaster* et *Inostemma* sont présents en hiver comme en été et ils sont capables de parasiter des larves provenant des deux types d'organe. Toutefois, il semble que *Platygaster* sp. attaque plus les larves issues d'inflorescences en hiver et en fin d'hiver, et que *Inostemma* sp. attaque plus les larves issues de jeunes feuilles en fin d'hiver et en été (à confirmer par les analyses). *Gastrancistrus* sp. apparaît uniquement en hiver sur les larves issues d'inflorescences. Comme démontré par Son et al. (2012) sur deux parasitoïdes (*Platygaster matsutama* et *Inostemma seoulis*) de cécidomyies, ce décalage peut être dû à des paramètres de développement thermique spécifiques à chacune des espèces. Il semblerait que les parasitoïdes utilisent de manière différente la ressource (origine des larves, saison, dynamique d'émergence) ce qui pourrait limiter la compétition entre ces trois espèces.



Ces trois parasitoïdes exploitent la capacité de reproduction continue de la cécidomyie à la Réunion. Toutefois, des études complémentaires doivent être menées pour déterminer quel(s) parasitoïde(s) est (sont) les mieux adaptés pour participer aux contrôles des populations de cécidomyies (élevages et lâchers de masse, manipulation de l'habitat).

### Références bibliographiques

- Murphy NP, Carey D, Castro LR, Dowton M, Austin AD (2007) Phylogeny of the platygastroid wasps (Hymenoptera) based on sequences from the 18S rRNA, 28S rRNA and cytochrome oxidase I genes: implications for the evolution of the ovipositor system and host relationships. *Biological Journal of the Linnean Society* **91**, 653-669.
- Noyes JS (2012) Universal Chalcidoidea Database. World Wide Web electronic publication, <http://www.nhm.ac.uk/chalcidoids>
- Prasad SN, Grover P (1974) Population fluctuation of *Erosomyia indica* Grover. *Cecidologia indica* **IX**, 1-38.
- Son Y, Chung YJ, Lee JH (2012) Differential thermal biology may explain the coexistence of *Platygaster matsutama* and *Inostemma seoulis* (Hymenoptera: Platygastriidae) attacking *Thecodiplosis japonensis* (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **15**, 465-471.
- Vincenot D, Normand F (2009) *Guide de production intégrée de mangues à la Réunion* CIRAD et Chambre d'Agriculture, Saint-Pierre, Ile de la Réunion, France. 121pp.

### III. Stades reproducteurs du manguiier

D'après Dambreville (2012),

**Stade A** : repos végétatif, bourgeons végétatifs non gonflés



#### **Stade B1**

##### Bourgeon gonflé :

Forme d'ogive, vert clair, écaillés protectrices non ouvertes



#### **Stade B2**

##### Début d'ouverture du bourgeon :

Les écaillés s'écartent au sommet du bourgeon, apparition de l'inflorescence (bractées)



#### **Stade C**

##### Ouverture du bourgeon :

Les écaillés sont complètement écartées et chutent, bractées de l'inflorescence bien visibles



#### **Stade D1**

##### Début de l'élongation de l'inflorescence :

Bractées toutes présentes et axes secondaires parallèles à l'axe principal de l'inflorescence



#### **Stade D2**

##### Début de l'élongation de l'inflorescence :

Les axes secondaires s'écartent de l'axe principal à partir de la base de l'inflorescence, chute des bractées



#### **Stade E**

##### Elongation de l'inflorescence :

Axes secondaires bien visibles et tous écartés de l'axe principal, pas de fleur ouverte



#### **Stade F**

##### Floraison :

Présence de fleurs ouvertes et de boutons floraux sur l'inflorescence :  
De la 1<sup>ère</sup> fleur qui s'ouvre à la dernière fleur encore ouverte



#### **Stade G**

##### Fin de floraison :

Plus de fleurs ouvertes, nombreuses fleurs sèches et présence de petits fruits verts

#### IV. Stades végétatifs du manguier

D'après Dambreville (2012),

**Stade A** : repos végétatif, bourgeons végétatifs non gonflés



##### **Stade B1**

Gonflement du bourgeon,  
sans ouverture des écailles



##### **Stade B2**

Début d'ouverture du  
bourgeon, feuilles serrées



##### **Stade C**

Ouverture du bourgeon,  
feuilles écartées



##### **Stade D**

Début d'élongation de  
l'unité de croissance,  
pétioles orientés à environ  
45°, limbes pliés par rapport  
à la nervure centrale



##### **Stade E**

Élongation de l'unité de  
croissance, pétioles  
orientés à environ 90°,  
limbes à demi ouverts par  
rapport à la nervure  
centrale et commençant à  
retomber



##### **Stade F**

Fin de l'élongation de  
l'unité de croissance,  
pétioles orientés à environ  
135°, limbes ouverts par  
rapport à la nervure  
centrale et retombant



##### **Stade G**

Fin de l'élongation de  
l'unité de croissance,  
décoloration et remontée  
des feuilles, pétioles  
orientés à environ 90°



##### **Stade H**

Unité de croissance adulte,  
pétioles orientés à environ  
45-60°, limbes verts

## V. Script R du modèle 2 de dispersion de la cécidomyie des fleurs du manguier

### Description et structure des fichiers de données

**infatot.df** : un dataframe avec toutes les ressources du verger;  
1 ligne = 1 ressource à un stade, une date et pour un demi-arbre donnés  
colonnes = Arbre, Moitié, Date, Stade, Coordonnée en X et Coordonnée en Y

**infboittot.df** : un dataframe avec seulement les ressources au-dessus des pièges;  
1 ligne = 1 ressource au dessus d'une piège à un stade, une date et pour un demi-arbre  
colonnes = Arbre, Moitié, Date, Stade, Coordonnée en X et Coordonnée en Y

**Larv.df** : un dataframe avec le nombre de larves interceptées par les pièges  
1 ligne = 1 nombre de larves interceptées à une date donnée au dessus d'une ressource  
colonnes = Date, Arbre, Moitié, Stade, Nombre de larves

**chutes.df** : un dataframe de toutes les coordonnées des points de chute des femelles dans le verger  
1 ligne = 1 point de chute  
colonnes= Coordonnée en X et Coordonnée en Y

### Fonction de calcul de la probabilité de tomber en chaque point de chute en fonction de la ressource (Modèle 2)

```
prbpasif.fct <- function(inflo.df,chutes.df,sigmapasif)
{
  dd <- outer(inflo.df$X,chutes.df$Xc,"-")**2
  dd <- dd+outer(inflo.df$Y,chutes.df$Yc,"-")**2
  dd <- dd/(2*sigmapasif*sigmapasif)
  dd[dd>700] <- 700
  dd <- exp(-dd)
  dd <- apply(dd,2,sum)
  dd <- dd/sum(dd)
  return(dd)
}
```

### Fonction de calcul de l'attractivité relative de chaque inflorescence du verger

```
attract.rel.f <- function(inflo.df,alpha,sigma,infboit.df,X,Y,prbpasif.fct=prbpasif.fct)
```

```
{
  distx <- (inflo.df$X-X)**2
  disty <- (inflo.df$Y-Y)**2
  disp <- (distx+disty)/(2*sigma*sigma)
  disp[disp>700] <- 700
  disp <- exp(-disp)
  attract <- alpha[inflo.df$stade]
  denom <- sum(attract*disp) # nombre
```

```

distx <- (infboit.df$X-X)**2
disty <- (infboit.df$Y-Y)**2
disp <- (distx+disty)/(2*sigma*sigma)
disp[disp>700] <- 700
disp <- exp(-disp)
attract <- alpha[infboit.df$stade]
num <- attract*disp # vecteur
res <- num/denom
return(res)
}

```

Fonction de calcul du nombre moyen de femelles sur chaque inflorescence au dessus des pièges

```

attracfem.f <- function(inflo.df,alpha,sigma,infboit.df,chutes.df,prbpassif,
                        attract.rel.f=attract.rel.f)
{
  res <- rep(0,dim(infboit.df)[1])
  for ( i in 1:dim(chutes.df)[1])
  {
    X <- chutes.df$Xc[i]
    Y <- chutes.df$Yc[i]
    res <- res+attract.rel.f(inflo.df,alpha,sigma,infboit.df,X,Y)*prbpassif[i]
  }
  return(res)
}

```

Fonction de calcul de la probabilité de tomber dans un piège

```

prob.boit.f <- function(inflo.df,alpha,sigma,sigmapassif,infboit.df,chutes.df,boit.dat,lambda,
                        Esp,      mort,      prbpassif,      betast,      attract.rel.f=attract.rel.f,
                        prbpassif.fct=prbpassif.fct,  attracfem.f=attracfem.f,  prob0.fct=prob0.fct,
                        phin.fct=phin.fct)
{
  reduc <- betast[infboit.df$stade]*Esp*mort
  attrac <- attracfem.f (inflo.df, alpha, sigma, infboit.df, chutes.df, prbpassif,
                        attract.rel.f=attract.rel.f)
  attrac <- attrac*lambda
  att <- split(attrac, paste(infboit.df$Arb, infboit.df$Moit), drop=T)
  red <- split(reduc, paste(infboit.df$Arb, infboit.df$Moit), drop=T)
  ii <- match(paste(boit.dat$Arb, boit.dat$Moit), names(att))

  prblarv <- NULL
  for( i in 1:length(ii))
  {
    l1 <- att[ii[i]]
    l2 <- red[ii[i]]
    nb <- boit.dat$NbLarv[i]
    if(nb < 170){
      jj <- prob0.fct(nb,l1[[1]],l2[[1]],phin.fct=phin.fct)
    }
  }
}

```

```

        prblarv <- c(prblarv,jj)}
    }
    return(prblarv) }

    prob0.fct <- function(n,lambda,mu,phin.fct=phin.fct)
{
### coeur de la compound-poisson de tirer n indivs
    x <- lambda*exp(-mu)
    if (n==0){ prb <- exp(-lambda+x) }
    if (n==1) { prb <- mu*x*exp(x)*exp(-lambda)}
    if (n>=2)
    {
        prb <- phin.fct(x,n)
        prb <- prb*exp(-lambda)*(mu**n)/factorial(n)
    }
    if (is.na(sum(prb))) { print("dans prb0.fct") }
    return(prb)
}

phin.fct <- function(x,n)
{
    param0 <- c(1,0)
    for( i in 2:n)
    {
        param1 <- c(rep(1,i),0)
        for(j in 2:i)
        {
            jj <- j-1
            param1[j] <- param0[j-1] +(jj+1)*param0[j]
        }
        param1[i] <- 1
        param0 <- param1
    }
    total <- exp(x)*sum(param1[1:n]*(x**(1:n)))
    return(total)
}

```

Fonction de calcul de la vraisemblance développée pour un calcul parallélisé (library doParallel)

```

mlogvrais1.f <- function(param, inflotot.df=inflotot.df, infboittot.df=infboittot.df,
                        chutes.df=chutes.df, Larv.df=Larv.df, attract.rel.f=attract.rel.f,
                        prbpassif.fct=prbpassif.fct, attracfem.f=attracfem.f,
                        prob.boit.f=prob.boit.f, prob0.fct=prob0.fct, phin.fct=phin.fct)
{
    ndate <- length(unique(Larv.df$Date))
    lambda <- exp(param[1:ndate])
    alpha <- exp(c(param[(ndate-1)+2],0,param[(ndate-1)+3:6]))
    betaE <- 1
    betast <- exp(c(param[(ndate-1)+7],0,param[(ndate-1)+8:11]))
}

```

